



**FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**MECANISMOS DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN  
DE LOS mRNAs DEL VIRUS SINDBIS**

**TESIS DOCTORAL**

**MANUEL GARCÍA MORENO**

**Madrid, 2015**



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**MECANISMOS DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN**  
**DE LOS mRNAs DEL VIRUS SINDBIS**

**TESIS DOCTORAL**

Memoria presentada por **Manuel García Moreno**, Licenciado en Biotecnología,  
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid  
Madrid, 2015





El trabajo presentado en esta tesis doctoral ha sido realizado en el **Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”**, bajo la dirección del Dr. Luis Carrasco Llamas y del Dr. Miguel Ángel Sanz Fernández, mediante la concesión de la beca FPI BES-2010-039571 del Ministerio de Economía y Competitividad. Ha sido financiado por el proyecto BFU2009-07352 otorgado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Ministerio de Economía y Competitividad.



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a Luis por ofrecerme la oportunidad de unirme a su grupo de investigación, por su dirección y confianza.

Por supuesto, gracias a Miguel Ángel por haber contribuido enormemente al desarrollo de este trabajo con su apoyo diario teórico y práctico.

Doy las gracias también a todos los compañeros que forman parte del laboratorio, y a los que han pasado por aquí a lo largo de estos años, por estar siempre dispuestos a echar una mano: Pablo, Ruth, Esther, Diana, Kike, Natalia y Juan.

Igualmente, agradezco la ayuda a todas las personas que han facilitado la realización de este trabajo, especialmente a quienes componen los servicios del centro.

Por último, quería agradecer a mis amigos Parras y Javi por tantos buenos momentos antes, durante y seguro que después de esta tesis. A Elena, por estar a mi lado cada día, incluso desde la distancia, y por sus ánimos. Y a mis padres, por su consejo y apoyo en todo momento aun desconociendo a qué me dedico.



## ÍNDICE

---



## ÍNDICE

<b>RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY).....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1.1. SINV: DESCRIPCIÓN GENERAL .....	6
1.2. MECANISMOS DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN EUCARIOTAS.....	9
1.2.1. Mecanismo canónico de iniciación de la traducción .....	9
1.2.2. Otros mecanismos de iniciación cap-dependientes .....	10
1.2.3. Mecanismo de iniciación interna de la traducción .....	11
1.2.4. Otros mecanismos de iniciación cap-independientes .....	12
1.3. INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN LOS mRNAs DE SINV .....	13
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1. Líneas celulares .....	19
3.2. Compuestos químicos.....	19
3.3. Plásmidos y manipulación de DNA en procedimientos de clonación .....	19
3.4. Transcripción <i>in vitro</i> de RNAs.....	21
3.5. Transfección de RNAs.....	21
3.6. Virus e infecciones virales.....	22
3.7. Traducción <i>in vitro</i> .....	22
3.8. Medición de actividad luciferasa.....	22
3.9. Marcaje radiactivo de proteínas.....	23
3.10. Inmunodetección de proteínas mediante <i>Western blot</i> .....	23
3.11. Inmunofluorescencias .....	23
3.12. Predicción de estructuras secundarias de RNA .....	24
3.13. Análisis de RNAs virales.....	24
3.14. Ensayos de inmunoprecipitación .....	25
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>

4.1. REQUERIMIENTO DE eIFs DURANTE LA TRADUCCIÓN DEL sgRNA DE SIN V EN LÍNEAS CELULARES DE VERTEBRADO E INVERTEBRADO .....	27
4.1.1. Requerimiento del eIF4A en células infectadas por el virus .....	27
4.1.2. Participación del eIF4A en la traducción del sgRNA de SIN V producido a partir de diferentes replicones.....	32
4.1.3. Mecanismo dual para la traducción del sgRNA de SIN V con respecto al requerimiento del eIF4A.....	33
4.1.4. Funcionamiento de eIFs en células de mosquito infectadas por SIN V .....	36
4.1.5. Análisis de la capacidad de la estructura DLP para conferir independencia de eIFs .....	37
4.1.6. Implicación de otros eIFs en la traducción del sgRNA de SIN V .....	41
4.2. ESTUDIO DEL MECANISMO DE SELECCIÓN DEL CODÓN DE INICIACIÓN EN EL sgRNA DE SIN V .....	49
4.2.1. Mecanismo de iniciación de la síntesis de proteínas dirigida por el sgRNA de SIN V.....	49
4.2.2. <i>Scanning</i> y selección del AUG en diferentes células donde replica SIN V: MEFs, MEFs PKR <sup>-/-</sup> y C6/36 .....	53
4.2.3. Traducción de variantes del sgRNA de SIN V en ausencia de replicación.....	55
4.2.4. Participación del eIF4A en la traducción de diferentes sgRNAs de SIN V. ....	58
4.2.5. Implicación del eIF2 en la selección del AUG .....	59
4.2.6. Influencia de la estructura DLP y de la L26S de SIN V en la traducción independiente del eIF2. ....	63
4.2.7. El <i>shunting</i> ribosomal no es operativo en el sgRNA AUG-hp de SIN V .....	65
4.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS REPETIDAS SITUADAS EN LA ZONA 3'-UTR DE LOS mRNAs DE SIN V.....	69
4.3.1. Mutación de los motivos presentes en la 3'-UTR de los mRNAs de SIN V. Efectos en la traducción del gmRNA.....	69
4.3.2. Importancia de la L26S de SIN V para la traducción en un contexto de replicación.....	72
4.3.3. Traducción de sgRNAs de SIN V con 5' y/o 3'-UTRs mutadas fuera de un contexto de replicación .....	74
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>79</b>
5.1. REQUERIMIENTO DE eIFs DURANTE LA TRADUCCIÓN DEL sgRNA DE SIN V EN LÍNEAS CELULARES DE VERTEBRADO E INVERTEBRADO .....	79
5.2. ESTUDIO DEL MECANISMO DE SELECCIÓN DEL CODÓN DE INICIACIÓN EN EL sgRNA DE SIN V .....	83
5.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS REPETIDAS SITUADAS EN LA ZONA 3'-UTR DE LOS mRNAs DE SIN V.....	88
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>91</b>



<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO .....</b>	<b>109</b>
Tabla S1.....	109
Tabla S2.....	110
Tabla S3.....	111
Tabla S4.....	112
Tabla S5.....	114
<b>ANEXO II. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS .....</b>	<b>115</b>



## SUMMARY

---



## RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)

Alphaviruses are responsible for a variety of diseases, including some fatal encephalitis, in humans and other vertebrates. Sindbis virus (SINV) is a representative member of alphaviruses, which contain a positive single-stranded RNA as genome. In the early phase after infection, this genomic RNA is translated following a canonical mechanism, while a subgenomic mRNA (sgmRNA) directs the synthesis of viral structural proteins during the late phase of infection, when the translation of host cellular mRNAs has been shut-off. The mechanism by which this sgmRNA is translated under these conditions has been the object of intensive research during the past few years.

In the present work we demonstrate that the eukaryotic initiation factor (eIF) 4A is not required to translate SINV sgmRNA in mammalian infected cells. However, eIF4A is required for efficient translation in cells transfected with *in vitro* synthesized sgmRNA. Therefore, this viral mRNA exhibits a dual mechanism for its translation. In addition, other eIFs including eIF4E or PABP may not participate in this process in infected cells. Furthermore, in this viral mRNA exists a hairpin structure (DLP) that confers eIF2, but not eIF4A independence. In sharp contrast to what is observed in mammalian cells, active eIF2 is necessary to translate SINV sgmRNA in insect cells, and the DLP does not confer any translational advantage. Nevertheless, eIF4A is dispensable for SINV sgmRNA translation in mosquito cells. These findings indicate that SINV sgmRNA translation requires different initiation factors in vertebrate and insect cells. Besides, we show that the translation mechanism of this mRNA involves the scanning of the 5' untranslated region (5'-UTR) by the preinitiation complex in both cell lines. Moreover, we have constructed some viral mRNAs bearing two AUG initiation codons that respond differentially to eIF2 $\alpha$  inactivation, indicating that AUG selection is dependent on the cellular context, the phosphorylation state of eIF2 $\alpha$  and the presence of regulatory elements such as DLP. Collectively, these results suggest that translation of alphavirus sgmRNA follows a novel scanning mechanism to initiate translation and to select the correct AUG initiation codon, without the participation of crucial eIFs.

Finally, we found a new motif, constituted by three repeated sequences, at the 3'-UTR that are necessary for the translation of both SINV genomic and subgenomic mRNAs in insect, but not in mammalian systems. Complementary sequences at the 5'-UTR also regulate SINV mRNA translation and transcription. Thus, these SINV repeated regions constitute the first example of a motif present at the 3'-UTR that provides translatability to mRNAs from an animal virus in a cell specific manner. In addition, these findings constitute a clue to better understand, at the molecular level, the evolution of alphaviruses and other arboviruses.



## ABREVIATURAS

---





**ABREVIATURAS**

<b>Ars</b>	Arsenito sódico
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>AUGi</b>	AUG iniciador
<b>BHK</b>	Célula de riñón de hámster neonato
<b>C</b>	Proteína de la cápsida
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>CITE</b>	Potenciador de la traducción cap-independiente
<b>CPM</b>	Cuentas por minuto
<b>CrPV</b>	Virus de la parálisis del grillo
<b>D.E.</b>	Desviación estándar
<b>DLP</b>	<i>Downstream loop</i>
<b>DMEM</b>	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
<b>eEF</b>	Factor de elongación de la traducción eucariótico
<b>eIF</b>	Factor de iniciación de la traducción eucariótico
<b>EMCV</b>	Virus de la encefalomiocarditis
<b>FCS</b>	Suero fetal de ternera
<b>G3BP</b>	Proteína de unión al dominio SH3 de Ras-GAP
<b>gmRNA</b>	RNA genómico 49S
<b>hipp</b>	Hipuristanol
<b>hpi</b>	Hora post-infección
<b>hpt</b>	Hora post-transfección
<b>IGR</b>	Región intergénica
<b>IRES</b>	Sitio de entrada interna del ribosoma
<b>JaCoP</b>	<i>Just Another Co-localization Plugin</i>
<b>L26S</b>	Secuencia líder del sgmRNA ó mRNA 26S
<b>luc</b>	Luciferasa
<b>MEF</b>	Fibroblasto de embrión de ratón
<b>Met-Cis</b>	Metionina-Cisteína
<b>Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup></b>	tRNA iniciador unido a metionina
<b>mRNA</b>	RNA mensajero

<b>nsP</b>	Proteína no estructural
<b>nts</b>	Nucleótidos
<b>ORF</b>	Fase abierta de lectura
<b>PABP</b>	Proteína de unión a la cola de poli(A)
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKR</b>	Proteína quinasa R
<b>PV</b>	Poliovirus
<b>rep</b>	Replicón
<b>RLU</b>	Unidades relativas de luz
<b>RRL</b>	Lisados de reticulocitos de conejo
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>Ser</b>	Serina
<b>SFV</b>	Virus del Bosque de Semliki
<b>SG</b>	Gránulo de estrés
<b>sgmRNA</b>	RNA subgenómico ó 26S
<b>SINV</b>	Virus Sindbis
<b>sP</b>	Proteína estructural
<b>Tg</b>	Tapsigargina
<b>TIA-1</b>	Antígeno intracelular de las células T
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>ufp</b>	Unidad formadora de placa
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>VSV</b>	Virus de la estomatitis vesicular
<b>wt</b>	Tipo salvaje o estándar ( <i>wild type</i> )

## INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de traducción y su regulación en células eucarióticas han sido objeto de intensa investigación durante los últimos años aportando resultados de gran interés. Esto ha dado lugar a numerosos descubrimientos, tan relevantes como: los microRNAs y sus funciones, como la regulación de la expresión génica por RNAs de interferencia [4,5]; la compartimentalización de la traducción de RNAs mensajeros (mRNAs) virales y celulares [6-8]; los mecanismos de iniciación de la traducción diferentes al canónico como el *leaky scanning*, la traducción independiente de cap mediada por IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) o CITEs (*Cap-Independent Translational Enhancers*), o el *shunting* [9]; la traducción de mRNAs virales sin la participación de diversos factores canónicos de iniciación (eIFs) [10-13]; el descubrimiento de nuevos eIFs [14,15]; la regulación de la traducción mediada por gránulos de RNA [16]; la iniciación desde codones diferentes al AUG y la traducción en las tres fases de lectura [17,18]; o la regulación de la expresión génica por uORFs (*Upstream Open Reading Frame*) localizados antes del AUG iniciador (AUGi) [19]. Nuestro grupo de investigación ha publicado recientemente varias observaciones de cierta trascendencia dentro del campo de la regulación de la traducción en células infectadas por distintas especies de virus animales. Hemos descrito, por ejemplo, que la traducción del mRNA subgenómico (sgmRNA) del virus Sindbis (SINV) opera sin los factores eIF4G y eIF2. Además, este mRNA presenta un mecanismo dual de traducción que depende del contexto en que ésta se lleve a cabo [12,20,21]. También comprobamos que diferentes RNAs de picornavirus se traducen de un modo dual: inicialmente, su traducción es dependiente del eIF2, pero en la fase tardía de la infección ésta cambia a un mecanismo eIF2-independiente [22]. Además, hemos observado que mRNAs recombinantes con IRES de distintos picornavirus no se traducen cuando son producidos por replicones de SINV [23], salvo que se coexpresen con la proteasa 2A de poliovirus (PV) [24]. También hemos descrito que la proteasa 2A es capaz de conferir independencia del factor eIF2 en la traducción de mRNAs con IRES de picornavirus [11]. El objetivo fundamental de esta tesis doctoral consiste en seguir profundizando en el estudio del mecanismo de traducción del sgmRNA de SINV en diferentes tipos celulares de vertebrado e insecto, donde desarrolla su ciclo biológico. Asimismo, queremos determinar con mayor precisión los requerimientos estructurales y funcionales que gobiernan la traducción de este mRNA viral. Creemos que es de gran interés dilucidar los mecanismos con los que se inicia la traducción de los mRNAs de alfavirus en las células infectadas, debido a la importancia médica humana y veterinaria de estos virus y a la creciente aparición de nuevas epidemias. El hecho de que los mRNAs de alfavirus puedan utilizar mecanismos de iniciación distintos del canónico, empleado mayoritariamente por los mRNAs celulares, podría servir para diseñar nuevas estrategias de inhibición selectiva de la traducción viral. Por otra parte, pensamos que estos resultados también son atractivos desde el punto de vista evolutivo, ya que estos virus parecen estar empleando mecanismos de iniciación que podrían ser muy primitivos.

### 1.1. SINV: DESCRIPCIÓN GENERAL

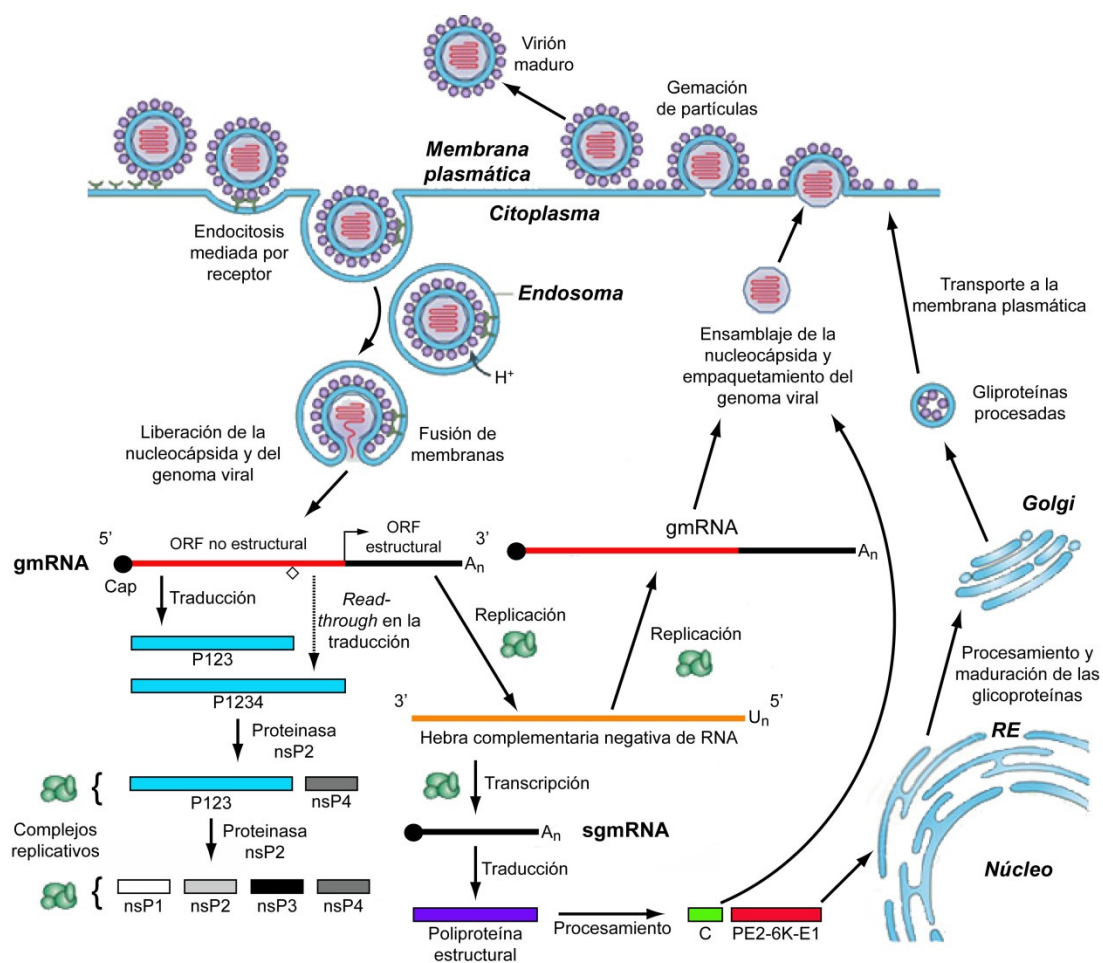
El género *Alfavirus* pertenece a la familia *Togaviridae* y comprende unas 30 especies [25,26], entre las que destaca SINV como miembro representativo. La mayoría de estos virus son portados por artrópodos hematófagos (generalmente mosquitos), y son transmitidos a una gran variedad de huéspedes tales como aves y vertebrados terrestres (marsupiales, primates no humanos, roedores, caballos, humanos, cerdos, ovejas...). Existen excepciones a la transmisión por mosquitos; este es el caso de los alfavirus de salmónidos y del virus del elefante marino del sur [3,27,28]. Como grupo, en los alfavirus existe una gran diversidad genética y una amplia distribución geográfica, lo que evidencia un origen muy antiguo y una diversificación posterior [28]. No obstante, cada virus individual tiene una distribución más limitada, aunque existen excepciones, como por ejemplo SINV [3]. Así, desde hace varios miles de años, los virus del Nuevo Mundo, entre los que destacan los virus de los complejos de la encefalitis equina del este y de la encefalitis equina venezolana, han evolucionado por separado de los virus del Viejo Mundo, incluidos en los complejos de SINV o del virus del Bosque de Semliki (SFV) [29]. Además, los alfavirus son responsables de numerosos brotes de enfermedades humanas y veterinarias alrededor de todo el mundo, con la excepción de la Antártida. En mamíferos, estos virus provocan infecciones agudas y de corta duración que están asociadas con enfermedades como encefalitis y poliartritis, y síntomas como dolores de cabeza, fiebre, sarpullidos, mialgia y artralgia, dependiendo de la especie viral [30]. Por ejemplo, los virus de las encefalitis equinas del este, oeste y venezolana pueden causar enfermedades neurológicas fatales en humanos y animales domésticos. Además, el virus Chikungunya produce una artralgia intensa, y ha resurgido recientemente como una seria amenaza para la salud humana [27]. Por el contrario, la replicación en insectos es persistente y no tiene, por lo general, consecuencias patológicas. Entre los alfavirus más estudiados se encuentran SINV, SFV, el virus Chikungunya y el virus de la encefalitis equina venezolana. A pesar de su débil patogenicidad, SINV se ha usado como modelo en múltiples estudios sobre la replicación del RNA viral y sobre las interacciones entre el virus y la célula huésped.

Las partículas de alfavirus están compuestas por una nucleocápsida envuelta por una bicapa lipídica que deriva de la célula huésped y que contiene 240 copias de cada una de las dos glicoproteínas (E1 y E2) codificadas por el virus. La nucleocápsida, de estructura icosaédrica, está formada por 240 copias de la proteína de la cápsida (C) y alberga el genoma, que consiste en una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, con un tamaño aproximado de 11.4-11.8 Kb. En concreto, el RNA genómico de SINV, denominado 49S o gmRNA, tiene una longitud exacta de 11.703 nucleótidos, posee una estructura cap en su extremo 5' y está poliadenilado en su extremo 3' (Figura 1). Se divide en dos fases abiertas de lectura u ORFs (*Open Reading Frames*), comprendiendo un dominio no estructural que codifica para las proteínas replicativas (nsPs), y un dominio estructural que codifica para las proteínas estructurales (sPs) del virus. El genoma de SINV sirve como mRNA y es traducido en las primeras etapas de la infección, tras la entrada del virus en la célula a través de endocitosis mediada por receptor, la liberación de la nucleocápsida al citoplasma (que es donde ocurre exclusivamente la replicación de alfavirus) y la unión de ésta a los

ribosomas, que desencadena la liberación del gmRNA para su traducción cap-dependiente [31]. De este modo, se genera una o dos poliproteínas, denominadas P123 o P1234, dependiendo de si la traducción termina en el codón de parada opal 1897 localizado entre las secuencias de la nsP3 y de la nsP4 (esto ocurre en el 90-95% de los casos) o si se produce un fenómeno de *readthrough* (que tiene una frecuencia muy baja) y la traducción continúa más allá de este codón normal de finalización de lectura [32]. Estas poliproteínas son cortadas por la nsP2 para producir las cuatro nsPs en la fase temprana de la infección: nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 [3,33]. Éstas constituyen, junto con determinados factores celulares, la RNA polimerasa dependiente de RNA necesaria para la replicación del genoma viral y la transcripción del sgmRNA [34]. Además, estas proteínas están implicadas en otras funciones como el corte de la poliproteína o el proceso de adición de la estructura cap al RNA. El complejo replicasa utiliza el gmRNA como molde para la síntesis de la hebra de RNA complementaria de sentido negativo, que a su vez sirve como molde para la síntesis de nuevas copias de gmRNA. La copia negativa del RNA también actúa como molde para sintetizar el sgmRNA (también llamado 26S), de 4.106 nucleótidos de longitud, que también contiene una estructura cap en su extremo 5' y una cola de poli(A) en el 3' [34]. En este caso, la transcripción opera a partir de un promotor interno localizado en la hebra negativa entre los dos ORFs (representado por una flecha en la Figura 1). La traducción del sgmRNA produce una poliproteína de la que se libera al citoplasma la proteína C, en virtud de su capacidad autoproteolítica, mientras que el resto de la poliproteína es translocado al retículo endoplásmico. En este compartimento, la poliproteína sufre cortes adicionales mediados por proteasas celulares y se generan las glicoproteínas de la envuelta E1 y E2, y los polipéptidos E3 y 6K [3]. A continuación, estas proteínas sufren modificaciones post-traduccionales que incluyen la glicosilación y la palmitoilación, y se reorganizan en la membrana plasmática. Por último, las proteínas C que conforman las nucleocápsidas interactúan con las colas citoplasmáticas de la proteína E2 para iniciar la gemación y producir las partículas virales con cubierta lipídica [28].

La función exacta de las nsPs ha sido objeto de abundante investigación. La nsP1 es un componente muy abundante de los complejos replicativos y tiene actividad tanto en forma de proteína madura como en los precursores P123 o P1234. Se trata de una proteína palmitoilada que participa directamente en la iniciación y elongación de la síntesis de la hebra negativa de RNA [35,36]. Durante este proceso, la nsP1 interactúa con la nsP4 [37,38]. Además, se han identificado varias regiones en la nsP1. La región amino-terminal posee actividades metiltransferasa y guanililtransferasa, y está implicada en la adición de la estructura cap a los RNAs virales de sentido positivo [39-41]. La asociación con las membranas celulares está promovida por una hélice anfipática localizada en la región central de la proteína [41], que sirve para anclar los complejos replicativos virales a las membranas [42]. Asimismo, se han distinguido varios dominios en la nsP2: un dominio amino-terminal con actividad helicasa de RNA, un dominio proteasa central que cataliza todas las reacciones de corte entre las nsPs, y un dominio inactivo de tipo metiltransferasa de RNA [43,44]. Aparte de su función en la síntesis de RNA viral, la nsP2 también está involucrada en la interferencia con la transcripción y la traducción celular. De esta manera la nsP2 puede antagonizar las respuestas antivirales celulares desencadenadas tras la infección por los alfavirus [45,46]. De

hecho, un porcentaje de la nsP2 viaja al núcleo y propicia el bloqueo de la exportación de RNAs celulares al citoplasma [46,47]. El papel exacto de la nsP3 en la replicación del virus sigue siendo poco conocido. La nsP3 se organiza en tres dominios: un macrodominio amino-terminal (o dominio X) [48], una región central específica de alfavirus, y una región C-terminal con una secuencia hipervariable. Los residuos localizados justo después del macrodominio participan en el posicionamiento del sitio de corte de P23 [49]. Además, la región carboxilo-terminal contiene varios sitios de fosforilación [50]. La nsP3 bloquea la formación de gránulos de estrés celulares (SGs) a través de la interacción de su dominio C-terminal con G3BP (proteína de unión al dominio SH3 de Ras-GAP), lo que conlleva la disgregación de los SGs, que están involucrados en determinados mecanismos antivirales innatos [51-53]. Finalmente, la nsP4 es una polimerasa de RNA dependiente de RNA implicada en la síntesis de los diferentes RNAs virales: gmRNA, sgmRNA y RNA de sentido negativo complementario al genoma [54]. Tanto P123 + nsP4 como nsP1 + P23 + nsP4 sintetizan preferentemente la cadena negativa del RNA viral [55,56]. El corte final de P23 genera las nsPs completamente maduras y cambia la producción de RNA de sentido negativo a positivo, para sintetizar los RNAs genómico y subgenómico. Mutaciones en la nsP2 o nsP3 en posiciones cercanas al sitio de corte de P23 alteran la replicación viral y la patogenicidad [57].



**Figura 1. Ciclo replicativo y organización del genoma de SINV.** Abreviaturas: *gmRNA*, RNA genómico; *sgmRNA*, RNA subgenómico; *C*, proteína de la cápsida; *nsP*, proteína no estructural; *ORF*, fase abierta de lectura; *RE*, retículo endoplasmático. ◊: codón de terminación opal 1897. Adaptado de [1] y [3].



## 1.2. MECANISMOS DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN EUCARIOTAS

La traducción es un proceso altamente conservado mediante el cual se enlazan diferentes aminoácidos según la secuencia de nucleótidos de un mRNA molde, para dar lugar a las proteínas. Este proceso se puede dividir en cuatro fases: iniciación, elongación, terminación y reciclado de los ribosomas [58]. La síntesis de proteínas juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica en células eucariotas, y está controlada sobre todo en su fase de iniciación. Se distinguen principalmente dos mecanismos de iniciación de la traducción en eucariotas: el mecanismo canónico, que es mayoritario e implica el escaneo o *scanning* desde la estructura cap en el extremo 5' de los mRNAs hasta el codón AUGi, y el mecanismo de iniciación interna, que posiciona directamente los ribosomas sobre el codón de iniciación [2].

### 1.2.1. Mecanismo canónico de iniciación de la traducción

El mecanismo canónico de iniciación de la traducción de los mRNAs comienza con el reconocimiento de la estructura cap metilada m<sup>7</sup>GpppN presente en el extremo 5' de los mRNAs eucariotas [59] por el complejo multiproteico eIF4F, que está formado por el factor de reconocimiento de cap eIF4E, la helicasa del tipo DEAD-box eIF4A y la proteína de andamiaje eIF4G (Figura 2) [2,58]. PABP (*poly(A) binding protein*) se une a la cola de poli(A) del extremo 3' de los mRNAs y al eIF4G, induciendo la circularización del mRNA [59,60], lo que podría facilitar el reciclado de los ribosomas. Además, el eIF2 interacciona con el tRNA iniciador unido a metionina (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>) y GTP, originando el complejo ternario Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-eIF2-GTP. Este complejo, junto con el eIF3, eIF1, eIF1A y probablemente el eIF5, reconoce la subunidad 40S del ribosoma para formar el complejo de preiniciación 43S [61]. La interacción entre el eIF3 y el dominio central del eIF4G promueve el acoplamiento del complejo de preiniciación 43S al extremo 5' de los mRNAs que contienen una estructura cap. La subunidad ribosomal 40S unida a todos estos eIFs se encuentra en una conformación “abierta”, es decir, competente para el *scanning*, un proceso que implica una inspección lineal base por base de la región 5' no traducida (5'-UTR) [62,63]. El complejo de preiniciación escanea entonces la secuencia líder del mRNA en dirección 5'→3' hasta que encuentra un codón de iniciación AUG [64,65] dentro de un contexto de secuencia adecuado para la iniciación [62,66]. Este *scanning* implica el desenrollamiento de la estructura secundaria de la secuencia líder gracias a la actividad helicasa de la subunidad eIF4A del complejo eIF4F, actuando conjuntamente con el eIF4B o el eIF4H [15]. Otras helicasas de RNA, incluyendo DHX29, también pueden participar en este proceso [15,67,68]. El *scanning* finaliza una vez que el complejo de preiniciación está posicionado sobre el codón de iniciación y se establece un apareamiento de bases entre el codón AUG y el anticodón presente en el Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, generándose el complejo de iniciación 48S. Seguidamente ocurren una serie de eventos moleculares secuenciales y reestructuraciones conformacionales que conducen a la conformación “cerrada” de la subunidad 40S del ribosoma, que está comprometida a continuar la traducción del mRNA [69,70]. La proteína eIF5, que posee actividad GTPasa, juega un papel central en la modulación de estos eventos, ya que

promueve el ensamblaje del complejo de preiniciación e interacciona con varios eIFs [71,72]. De hecho, el carboxilo-terminal del eIF5 interactúa dinámicamente con el eIF1 y el eIF2β. Tras reconocerse el AUGi y establecerse el apareamiento de bases codón-anticodón, el extremo carboxilo del eIF5 favorece la disociación del eIF1, lo que permite la hidrólisis del GTP del complejo ternario mediada por el eIF5 y la liberación del fosfato inorgánico derivado [70,73]. El cuerpo plegado del eIF1 se localiza principalmente en el sitio A de la subunidad ribosomal 40S, pero la cola carboxilo-terminal solapa parcialmente con el sitio P entorpeciendo la acomodación total del Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> a este sitio [74]. Además, el extremo carboxilo del eIF1A se aproxima al amino-terminal del eIF5 [69]. Este movimiento está acoplado a la salida del eIF1, que deja libre el sitio P y permite que el tRNA iniciador se una con más fuerza a este sitio. Simultáneamente a esta reorganización, el eIF5B-GTP puede interaccionar ahora con la subunidad 40S, estimulando la unión de la subunidad 60S [75] y promoviendo la salida del eIF2-GDP junto con otros eIFs, excepto el eIF1A y el eIF5B. Para que el eIF2 vuelva a ser funcional, es necesario que el eIF2B intercambie el GDP por GTP antes de la siguiente ronda de iniciación. Posteriormente, el eIF5B hidroliza el GTP, y se libera el eIF1A y el eIF5B unido a GDP de los ribosomas 80S ensamblados y competentes para la elongación. La fase de iniciación acaba cuando el Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> se encuentra anclado al sitio P del ribosoma 80S, dejando libre el sitio A. La unión del complejo aminoacil-tRNA-eEF1-GTP a este sitio inicia la fase de elongación.

### 1.2.2. Otros mecanismos de iniciación cap-dependientes

Además del modelo de *scanning*, existen una serie de mecanismos de iniciación de la traducción que también dependen de la existencia de una estructura cap pero que no son considerados canónicos, y que se han descrito sobre todo en mRNAs virales.

El mecanismo conocido como *leaky scanning* se caracteriza porque la subunidad ribosomal 40S escanea la región 5'-UTR pero pasa de largo el primer AUG que encuentra y que, por lo general, está presente dentro de un contexto de secuencia subóptimo. La iniciación de la traducción se produce entonces desde un codón AUG posterior [76].

El mecanismo de salto o *shunting* combina características del mecanismo de *scanning* y de la iniciación interna. En primer lugar, los ribosomas inician un *scanning* desde la estructura cap 5', pero luego encuentran determinadas secuencias en el RNA que regulan su translocación directa a una región posterior, saltándose así segmentos grandes de la 5'-UTR que pueden contener codones AUG y estructuras secundarias fuertes [77,78].

También se distingue un mecanismo de terminación-reiniciación, en el que un segundo ORF del mRNA puede ser traducido sin necesidad de que la subunidad 40S se separe del mRNA tras alcanzar el codón de parada del primer ORF, reanudándose el *scanning* al terminar la primera traducción [76].

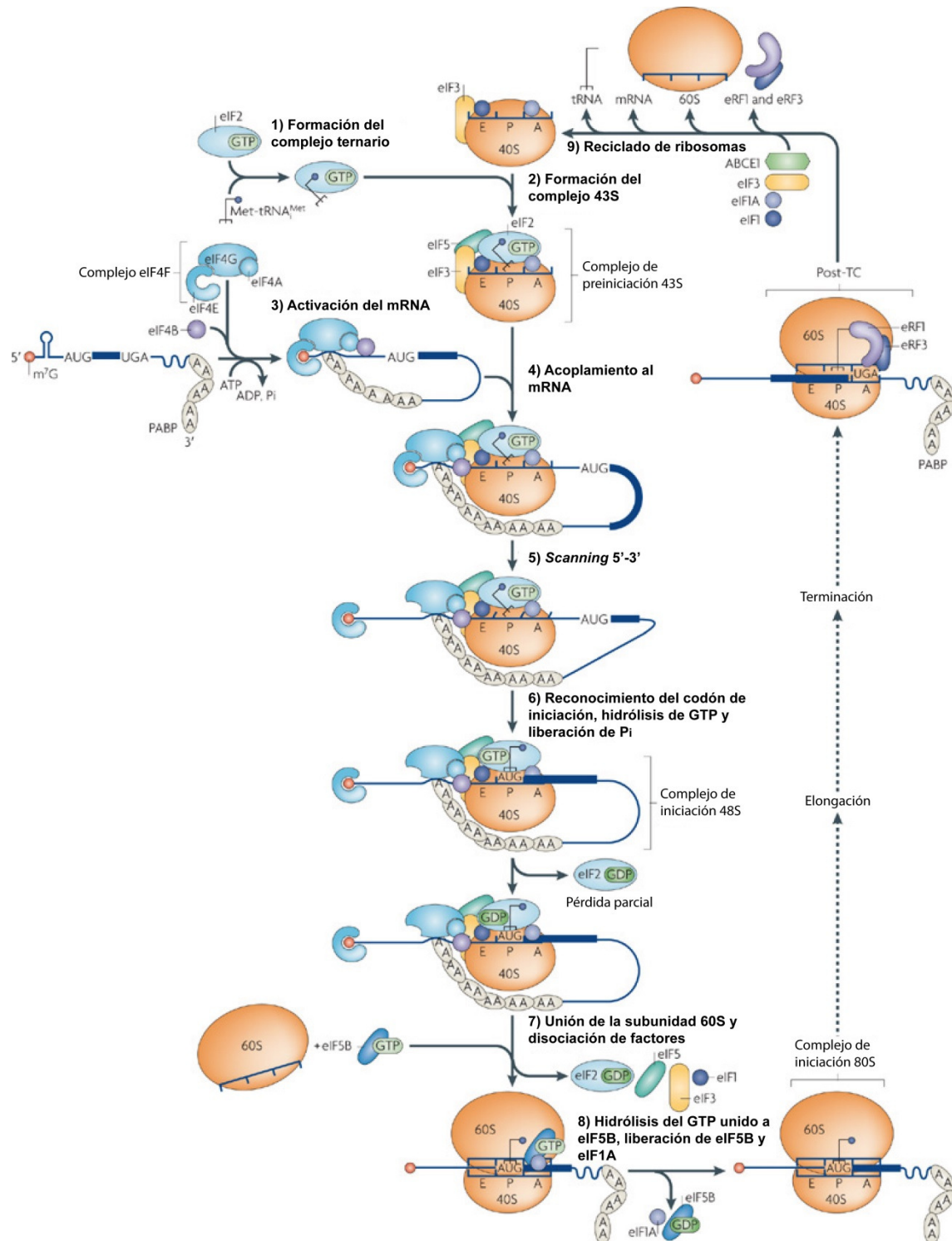


Figura 2. Esquema de la ruta canónica de iniciación de la traducción en eucariotas. Adaptado de [2].

### 1.2.3. Mecanismo de iniciación interna de la traducción

Muchos mRNAs celulares y virales contienen elementos denominados IRES dentro de sus regiones 5'-UTR, que dirigen la traducción mediante un mecanismo no canónico e independiente de la estructura cap [79,80]. En estos casos, los ribosomas se reclutan a posiciones internas en el mRNA cercanas al AUGi (o

directamente sobre él) en ausencia de *scanning* de la 5'-UTR, y en muchas ocasiones sin la participación de ciertos eIFs [2].

Los IRES se clasifican en función a su origen, su estructura secundaria y su funcionalidad [81,82]. Por un lado, podemos distinguir dos grandes grupos: IRES celulares o IRES virales. Estos últimos se dividen en cuatro grupos según su origen: 1) IRES de picornavirus; 2) IRES de flavivirus; 3) IRES de retrovirus; 4) IRES de dicistrovirus. Los IRES de picornavirus se han subdividido, a su vez, en cuatro clases: clase I (virus de la polio, rinovirus), clase II (virus de la fiebre aftosa, virus de la encefalomiocarditis), clase III (virus de la hepatitis A) y clase IV (teschovirus porcino) [83].

Los requerimientos de eIFs de los distintos IRES son muy diversos. La mayoría de los IRES no requieren el complejo eIF4F intacto, y pueden traducirse sin el eIF4E y con el factor eIF4G hidrolizado por proteasas como las de picornavirus. Otros factores prescindibles en algunos de estos IRES pueden ser el eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B o eIF2, aunque la mayoría necesita supuestamente la presencia del eIF3 [2]. Esto, sin embargo, no ha sido estudiado en células infectadas y es posible que muchos de los requerimientos de eIFs descritos hasta la fecha cambien en los próximos años, tal y como se ha visto recientemente con respecto a la utilización del eIF2 y del eIF4G por algunos IRES de picornavirus [11,22,84,85]. El caso más extremo es el IRES de la región intergénica (IGR) de diversos dicistrovirus como el virus de la parálisis del grillo (CrPV) [86]. Este IRES es capaz de iniciar la traducción internamente en ausencia de todos los eIFs. Además, esta traducción se inicia sobre un codón distinto al AUG. Por otra parte, el mecanismo de iniciación en algunos IRES está modulado también por ciertos factores trans-activadores específicos (ITAFs), que podrían funcionar estabilizando la conformación tridimensional óptima de los IRES [76].

#### **1.2.4. Otros mecanismos de iniciación cap-independientes**

En algunos virus de plantas con genomas de RNA, ciertas secuencias conocidas como CITEs determinan un modo de traducción diferente independiente de cap [87]. Estas secuencias pueden encontrarse en diversas regiones del genoma, aunque en la mayoría de los casos se localizan en la 3'-UTR. Se piensa que la función principal de los CITEs es reclutar componentes de la maquinaria de traducción, como el complejo eIF4F o incluso subunidades ribosomales. Dichos componentes son transferidos a continuación a la secuencia líder 5' a través de interacciones de larga distancia entre las regiones 5' y 3' que circularizan el mRNA, pudiendo comenzar entonces un *scanning* hasta alcanzar el codón AUGi [88-90]. Se ha descrito que este tipo de interacciones en ciertos RNAs virales de polaridad positiva pueden estar involucradas en la traducción del RNA, en la replicación o en la transcripción [91]. No tenemos constancia de que se haya documentado la presencia de CITEs en genomas de RNA de virus animales.

Ciertos virus emplean también mecanismos de traducción cap-independientes alternativos, que implican la unión covalente de una proteína viral al RNA del virus, la cual recluta diferentes eIFs y actúa, por tanto, como un análogo de cap [76,92].

### 1.3. INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN LOS mRNAs DE SINV

Como se ha descrito en el subapartado anterior, existen una variedad de mecanismos de iniciación de la traducción para mRNAs virales [12,86,93,94]. En algunos casos, los mRNAs virales se traducen siguiendo el modo canónico de iniciación, mientras que en otros casos, la traducción de los mRNAs virales tiene lugar en ausencia de uno o más eIFs [10,13,95,96]. Los alfavirus poseen dos tipos de mRNAs que se traducen a distintos tiempos durante el ciclo de infección y mediante mecanismos diferentes, pese a que ambos contienen una estructura cap en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el 3': el gmRNA se traduce en los primeros momentos de la infección siguiendo un mecanismo canónico y da lugar a las nsPs 1-4, mientras que el sgmRNA dirige la síntesis de las proteínas estructurales durante la fase tardía de la infección [3] mediante un mecanismo no canónico pero no comprendido bien del todo. En células de mamífero, la traducción del sgmRNA ocurre principalmente cuando la síntesis de proteínas celulares ha sido drásticamente detenida; por tanto, la maquinaria de traducción celular está dedicada casi por completo a la síntesis de las proteínas estructurales del virus. Además, se ha descrito que la traducción del sgmRNA está acoplada a la maquinaria transcripcional del virus y únicamente el sgmRNA producido mediante transcripción viral dirige eficientemente la síntesis de proteínas virales [97].

La replicación de SINV en células infectadas de vertebrados afecta a muchos procesos celulares. Los dos eventos más importantes son la inhibición o *shut-off* de la transcripción y de la traducción de los mRNAs celulares, que ocurren independientemente el uno del otro [98]. La inhibición de la traducción celular tiene lugar entre las 4 y las 8 horas después de comenzar la infección y en ella están involucrados dos mecanismos diferentes: uno dependiente de la proteína quinasa R (PKR, *Protein Kinase R*) y otro independiente de PKR. Esta proteína se activa por moléculas de RNA de doble cadena sintetizadas durante la replicación viral. Dichas moléculas se unen a PKR provocando cambios conformacionales en la proteína que inducen su actividad quinasa, lo que conlleva la fosforilación de la propia PKR y también de la subunidad  $\alpha$  del eIF2 en la Serina 51 (Ser51), impidiendo el recambio de GDP por GTP e inactivando dicho factor para traducción. El eIF2 es necesario durante la etapa de iniciación ya que transporta el Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> al sitio P del ribosoma [2], y su inactivación en las infecciones con alfavirus contribuye en buena parte al fenómeno de *shut-off* traduccional [99]. Sin embargo, existen evidencias sólidas que indican que el mecanismo independiente de PKR empleado por SINV para inhibir la traducción celular es la principal ruta reguladora del *shut-off* [100], aunque su modo de acción sigue siendo desconocido. El desequilibrio de las concentraciones iónicas en el citoplasma de las células infectadas, o la liberación de proteínas celulares del núcleo al citoplasma, se han propuesto también como posibles causas del *shut-off* [99,101,102]. El análisis de variantes de alfavirus con

mutaciones en las nsPs apunta a que nsP2 es la principal responsable de la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares tras la infección viral [45,100,103]. En concordancia, una variante de SINV con una mutación puntual en la prolina 726 de la nsP2 es deficiente en la inducción del *shut-off* traduccional [104]. Existen estudios recientes que han sugerido que la eficiencia traduccional del sgRNA de SINV y la cantidad de éste son importantes para que ocurra este fenómeno [105]. Sin embargo, estas observaciones contrastan con el hecho de que replicones que sólo expresan las nsPs también suprimen potentemente la traducción celular [97,106]. Recientemente hemos descrito que existe una correlación entre la alta replicación viral, la salida de proteínas nucleares al citoplasma y la inhibición de la síntesis de proteínas celulares [107]. En este sentido, la infección de células de mosquito con alfavirus induce una baja replicación viral y no bloquea la síntesis de proteínas celulares [108]. De hecho, en insectos se activa la ruta PI3K-Akt-TOR tras la infección con SINV, aumentando la fosforilación de la proteína 4E-BP1 y la disponibilidad del eIF4E, lo que supone un incremento de la traducción cap-dependiente general con el objetivo, probablemente, de contribuir al establecimiento de una infección persistente en células de artrópodos [109]. Por tanto, la inhibición de la traducción del huésped y el resultado final de la infección de SINV es diferente en células de mamífero y de mosquito [110].

Curiosamente, tanto el mecanismo de *shut-off* de la traducción celular dependiente de PKR como el independiente de PKR afectan a los mRNAs del huésped pero no tienen efectos significativos sobre la traducción del sgRNA de SINV. Muchos mRNAs virales contienen elementos estructurales que mejoran su traducibilidad en este tipo de condiciones. En células infectadas por SINV, la resistencia a la inhibición de la traducción se debe en parte a la presencia de una estructura en forma de tallo-lazo rica en GC, localizada entre los nucleótidos 27 y 89 posteriores al codón AUGi, dentro de la secuencia codificante de la proteína C [111]. Esta estructura fue denominada posteriormente DLP, por *downstream loop* [21], y tiene tres funciones principales en el sgRNA: potencia su traducción en células infectadas pero no en células sin infectar [106,111], es necesaria para superar la fosforilación del eIF2 $\alpha$  derivada de la infección en células de mamífero [21] y señala el codón de iniciación correcto en el contexto de infección [12]. En otros alfavirus, como SFV, también se ha descrito una estructura similar que potencia la traducción viral y contrarresta la inhibición de la traducción causada por la fosforilación del eIF2 $\alpha$  [99]. No obstante, más adelante se discutirá que este tipo de estructuras no deberían ser consideradas como potenciadores traduccionales en sentido estricto. Por el contrario, el evento de fosforilación del eIF2 $\alpha$  no se observa en células de insecto infectadas por SINV, debido a la ausencia de PKR [112,113]. Se ha propuesto que esta estructura fue adquirida durante la evolución para permitir a los alfavirus infectar eficientemente nuevos huéspedes vertebrados [113].

Aun así, la presencia de esta estructura en el sgRNA de SINV no es suficiente para conferirle traducibilidad cuando una célula es infectada: el contexto celular también tiene gran importancia y determina el mecanismo de iniciación de la traducción. El sgRNA de SINV sintetizado *in vitro* se traduce mediante la vía canónica en células sin infectar al igual que en sistemas libres de células, pero el mismo mRNA, cuando se sintetiza por la maquinaria de transcripción viral en un contexto de infección, tiene bajos requerimientos

de algunos eIFs [12,97]. Muchas secuencias y estructuras localizadas en las regiones 5'-UTRs y, como se ha mencionado, también a continuación del AUGi, pueden promover la interacción con la maquinaria de síntesis de proteínas, permitiendo que estos mRNAs sean traducidos en ausencia de ciertos eIFs. En el caso del sgRNA de SINV, la traducción ocurre a niveles del control cuando prácticamente todo el eIF2 $\alpha$  ha sido fosforilado [12,21,99]. Además, el corte del eIF4G por proteasas virales [20] o la inhibición del eIF4A por hipuristanol (como se demostrará en el apartado 4.1.) tienen poco efecto sobre la síntesis de proteínas dirigida por el sgRNA. También se ha sugerido que los sgRNAs de alfavirus tienen bajos requerimientos del eIF4E y del eIF4B [114,115], pese a que la traducción dirigida por el sgRNA es estrictamente dependiente de la presencia de una estructura cap en el extremo 5' [114,116]. Por otra parte, ciertos componentes de la maquinaria de traducción como el eIF3, el eEF2 y los ribosomas se distribuyen, tras la infección con SINV, en una región perinuclear enriquecida en proteína C donde está llevándose a cabo la transcripción y traducción viral, mientras que el eIF4E, el eIF4G y el eIF2 $\alpha$  se localizan en áreas diferentes, sugiriendo que no participan en la iniciación de la traducción viral [12]. Este reducido requerimiento de eIFs puede influir sobre la capacidad del sgRNA para traducirse eficientemente en un entorno en el que la traducción celular está inhibida.

En condiciones fisiológicas tras la infección con SINV, aún no se conoce con exactitud cuántos eIFs participan en la traducción del sgRNA, ni el mecanismo preciso de reconocimiento de cap y selección del codón de iniciación en ausencia del eIF2 activo y un complejo eIF4F intacto. En sistemas reconstituidos *in vitro*, el sgRNA de SINV puede traducirse sin el eIF2, únicamente con el eIF2D (o MCT-1/DENR), DHX29 y el eIF3, y bajo estas condiciones, los ribosomas 80S interaccionan directamente con el codón de iniciación AUG sin *scanning* previo de la región 5'-UTR [13]. Recientes estudios han demostrado que algunas proteínas virales pueden modificar los requerimientos de eIFs. Por ejemplo, la proteína N de hantavirus [117], la proteína PB2 del virus influenza [118] o la proteasa 2A de PV [11] posibilitan la traducción eficiente de mRNAs virales en ausencia de algunos eIFs. En el caso de los alfavirus, se ha visto que la nsP2 de diferentes especies interacciona con la proteína ribosomal S6 en células infectadas de mamífero y mosquito [119]. Según los autores, la nsP2 podría contribuir a la traducción diferencial de los mRNAs celulares y virales. Por tanto, hay que tener en consideración que el análisis de la traducción viral en células transfectadas, en sistemas libres de células o en sistemas reconstituidos no reflejan con exactitud las condiciones fisiológicas bajo las que se traducen los mRNAs virales en células infectadas [120]. En esta línea, existen evidencias de que no se produce iniciación interna en sgRNAs de SINV bicistrónicos expresados en células en un contexto de replicación viral [23], en clara oposición al mecanismo descrito en sistemas reconstituidos *in vitro*. Por otra parte, se ha sugerido que la función del eIF2 es reemplazada por el eIF2A en células infectadas por SINV [21], a diferencia de los sistemas *in vitro* en los que se propuso el eIF2D o la combinación de MCT-1/DENR como sustitutos.

También se ha demostrado que la secuencia líder del sgRNA (L26S), en combinación con la estructura DLP, está implicada en la traducibilidad del sgRNA en células de vertebrado [23,105].

Particularmente, la delección de los nucleótidos 11 al 20 de la región 5'-UTR tiene un efecto perjudicial en la traducción en células infectadas [105].

Por otro lado, SINV incluye en su 3'-UTR, que es relativamente larga (323 nucleótidos), una secuencia conservada de 19 nucleótidos que, junto con al menos 11 nucleótidos de la cola de poli(A), forma parte del promotor necesario para sintetizar la cadena negativa de RNA [121,122]. Antes de esta región conservada existe una secuencia rica en U, de alrededor de 60 nucleótidos, que interacciona con la proteína HuR del huésped y está involucrada en la estabilización del mRNA durante la infección [123-125]. Además, en la 3'-UTR hay tres estructuras repetidas con forma de tallo-lazo que están presentes no sólo en los alfavirus, sino también en otros virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) [122,126,127]. Estos elementos, al igual que el dominio rico en U, podrían contribuir a la represión de la deadenilación de los mRNAs de alfavirus [128]. La delección de la mayor parte de la 3'-UTR, manteniendo la secuencia conservada de 19 nucleótidos, disminuye la replicación de SINV en células de mosquito mucho más que en células de pollo [129]. Además, la mutagénesis de estas regiones tiene efectos diferenciales sobre la replicación viral en ratones y en cultivos de células murinas [130] dependiendo, incluso, del tejido analizado. En este sentido, se ha especulado con que dichas regiones podrían ser importantes para la regulación de la traducción a través de la interacción con determinados componentes específicos de la célula huésped [3]. No obstante, su funcionamiento exacto sigue siendo poco claro.

En resumen, todos estos estudios han desvelado la existencia de distintos elementos reguladores de la transcripción y de la traducción del sgmRNA de SINV, aunque el mecanismo de acción de cada uno de ellos a nivel molecular sigue siendo objeto de investigación.



## OBJETIVOS

---



## 2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral han sido:

- Determinar la participación del eIF2 y del eIF4A en el proceso de iniciación de la traducción de los mRNAs de SINV en diferentes contextos: células infectadas, células sin infectar transfectadas y sistemas acelulares.
- Establecer si existe un mecanismo de *scanning* en la iniciación de la traducción del sgRNA de SINV y en la selección del codón AUG iniciador.
- Examinar los requerimientos estructurales y funcionales del sgRNA de SINV, y su capacidad de conferir independencia del eIF2 y del eIF4A, centrándonos en el papel de la estructura DLP, de la secuencia líder del sgRNA y del contexto de secuencia que rodea al codón de iniciación AUG.
- Estudiar ciertas secuencias y/o estructuras repetidas presentes en la región 3' no codificante de los mRNAs de SINV y su importancia en la regulación de la síntesis de proteínas.
- Analizar el comportamiento traduccional de los mRNAs de SINV en células de mamífero e insecto, enfocando el estudio, sobre todo, en la traducción del sgRNA.



## MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en este trabajo fueron:

**BHK-21.** Células de riñón de hámster neonato. Obtenidas de *American Type Culture Collection* (ATCC). Se crecieron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal de ternera (FCS) al 5%.

**MEFs.** Fibroblastos de embrión de ratón. Obtenidas de ATCC. Cultivadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en DMEM suplementado con FCS al 10%.

**MEFs PKR<sup>-/-</sup>.** Fibroblastos de embrión de ratón derivados de ratones depletados de la proteína PKR [131]. Se mantuvieron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en DMEM suplementado con FCS al 10%.

**C6/36.** Células de *Aedes albopictus*. Obtenidas de ATCC. Cultivadas a 28°C sin suministro de CO<sub>2</sub> en medio M3 suplementado con FCS al 10%.

#### 3.2. Compuestos químicos

En este trabajo se usaron diferentes inhibidores químicos, a las concentraciones indicadas en cada caso: hipuristanol (cedido amablemente por J. Pelletier, McGill University, Montreal, Canadá), tapsigargina (*Sigma*), arsenito sódico (*Riedel-de Haën*), cicloheximida (*Sigma*) y 4EGI-1 (*Calbiochem*).

#### 3.3. Plásmidos y manipulación de DNA en procedimientos de clonación

Los plásmidos empleados en el apartado 4.1. se describen en la tabla S1. El plásmido pT7 rep C+luc ΔDLP se construyó digiriendo el plásmido pT7 SV ΔDLP [21] con las enzimas de restricción (*New England Biolabs*) HpaI y AatII e insertando este fragmento en el vector pT7 rep C+luc [97]. Para obtener el plásmido pT7 C+luc ΔDLP, primero se usó pT7 rep C+luc ΔDLP como molde en una reacción de PCR con los oligonucleótidos 5'SacI-T7prom y 3'Aat (ver tabla S2). A continuación, el producto de PCR se digirió con SacI y AatII y se insertó en los sitios de restricción correspondientes del vector pT7 rep C+luc.

Los plásmidos usados en la sección 4.2. se detallan en la tabla S3. La secuencia líder del sgRNA de SINV en los plásmidos pT7 rep C+luc hp, pT7 rep C+luc AUG-hp, pT7 rep C+luc CAA<sub>14</sub> and pT7 rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> se alteró mediante PCR solapante usando los oligonucleótidos listados en la tabla S2. Las amplificaciones dobles se realizaron de la siguiente manera. En el primer paso de PCR, se usaron los primers específicos 5' y 3'Aat, con pT7 rep C+luc como DNA molde. En otra PCR se emplearon los primers

específicos 3' y 5'Hpa, con el mismo molde. Se mezclaron los dos productos de PCR y se realizó una segunda PCR con los primers 5'Hpa y 3'Aat. Después, los productos de la PCR doble se digirieron con las endonucleasas HpaI y AatII y se insertaron en los mismos sitios de restricción del plásmido pT7 rep C+luc. Para obtener los sgmRNAs correspondientes mediante transcripción *in vitro*, se construyeron los plásmidos pT7 C+luc hp, pT7 C+luc AUG-hp, pT7 C+luc CAA<sub>14</sub> y pT7 C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> usando los plásmidos descritos como moldes en reacciones de PCR con los oligonucleótidos 5'SacI-T7prom y 3'Aat. Los productos de PCR obtenidos se cortaron a continuación con las enzimas SacI y AatII y se insertaron en las dianas correspondientes de pT7 rep C+luc. Para construir los plásmidos pT7 rep C+luc LhpL y pT7 rep C+luc hSTOPp, se realizó en primer lugar una PCR con los primers específicos 3' y 5'Hpa, empleando pT7 rep C+luc o pT7 rep C+luc AUG-hp, respectivamente, como DNAs molde. Los productos de la reacción se clonaron en el vector intermedio phpL26S usando las dianas de restricción PstI y HpaI. Este vector phpL26S deriva del plásmido pT7 rep C+luc hp y carece del sitio de restricción PstI, localizado fuera de la región delimitada por el sitio de corte HpaI en el extremo 5' y el sitio AatII en el 3'. A continuación, el fragmento comprendido entre las dianas HpaI-AatII del vector phpL26S se transfirió al plásmido pT7 rep C+luc. El plásmido pT7 SV AUG-CAA<sub>14</sub> proviene de insertar en pT7 SVwt el producto de la digestión de pT7 rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> con SpeI y AatII. Para generar los plásmidos pT7 rep C+luc STOP y pT7 rep C+luc hpSTOPhp2, se hizo una PCR con los correspondientes primers específicos 5' y 3'Aat, y pT7 rep C+luc AUG-hp como DNA molde. Los productos de PCR se digirieron posteriormente con las enzimas PstI y AatII, y se clonaron en los mismos sitios del vector intermedio pAUGhpL26S. El fragmento entre las dianas HpaI-AatII fue transferido finalmente a pT7 rep C+luc. El vector pAUGhpL26S se construyó clonando en phpL26S el fragmento derivado de la digestión de pT7 rep C+luc AUG-hp con HpaI y PstI. El plásmido pT7 rep C+luc hp30 se creó mediante la realización de una PCR con los primers 5'hp30 y 3'Aat, usando pT7 rep C+luc como DNA molde. El producto de la PCR se cortó con las enzimas PstI y AatII, y se clonó en phpL26S. Tras esto, se transfirió el fragmento HpaI-AatII desde el vector phpL26S hasta pT7 rep C+luc usando las dianas citadas.

Los plásmidos empleados en la sección 4.3. se describen en la tabla S4. Las regiones 5' y 3'-UTRs del sgmRNA de SINV fueron alteradas mediante mutagénesis dirigida con el kit comercial *QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)*, usando los plásmidos molde y los primers de la tabla S5. Para sintetizar los sgmRNAs correspondientes mediante transcripción *in vitro*, se generaron los plásmidos pT7 C+luc 3'/1, pT7 C+luc 3'/2, pT7 C+luc 3'/3, pT7 C+luc 3'/1+2 y pT7 C+luc 3'/1+2+3 obteniendo, en primer lugar, productos de amplificación mediante PCRs con los oligonucleótidos 5'SacI-T7prom y 3'Aat, y pT7 rep C+luc como DNA molde. Estos productos de PCR se insertaron en los plásmidos correspondientes usando las dianas SacI y AatII. El plásmido pT7 C+luc sg5'/12-18 se construyó usando pT7 rep C+luc sg5'/12-18 como molde en una reacción de PCR con los oligonucleótidos 5'SacI-T7prom y 3'Aat. El producto obtenido se cortó con las enzimas de restricción SacI y AatII y se clonó en los sitios equivalentes de pT7 rep C+luc. El plásmido pT7 C+luc sg5'/12-18 + 3'/1+2+3 se hizo transfiriendo al vector pT7 C+luc 3'/1+2+3 el producto digerido SacI/AatII procedente de pT7 C+luc sg5'/12-18. Para transcribir *in vitro* los gmRNAs de SINV no



replicativos con secuencias 5' y 3'-UTRs mutadas, se diseñaron los siguientes plásmidos. pToto1101/Luc  $\Delta$ nsP4, pToto1101/Luc  $\Delta$ nsP4 3'/1+2 y pToto1101/Luc  $\Delta$ nsP4 3'/1+2+3 se construyeron digiriendo primero los plásmidos pT7 rep C+luc, pT7 rep C+luc 3'/1+2 y pT7 rep C+luc 3'/1+2+3, respectivamente, con las endonucleasas de restricción EcoNI (extremos romos) y XhoI. Los fragmentos digeridos, que contienen las diferentes 3'-UTRs, se insertaron entonces en pToto1101/Luc [132] usando las dianas de corte XhoI y HpaI (extremos romos). Los plásmidos pToto1101/Luc  $\Delta$ nsP4 g5'/12-18 y pToto1101/Luc  $\Delta$ nsP4 g5'/12-18 + 3'/1+2+3 se generaron insertando el producto de una PCR doble, digerido con SacI y AfeI, en los vectores pToto1101/Luc  $\Delta$ nsP4 y pToto1101/Luc  $\Delta$ nsP4 3'/1+2+3, respectivamente. Las amplificaciones dobles se realizaron de la siguiente manera. Primero se hizo una PCR con los primers 5'gen7 y 3'AfeI-gen7, y pToto1101/Luc como DNA molde, y después otra PCR con los primers 5'SacI-gen7 y 3'gen7, empleando el mismo molde. Estos productos se mezclaron para llevar a cabo una segunda PCR con los primers 5' SacI-gen7 y 3' AfeI-gen7.

Todas las construcciones producidas fueron secuenciadas para comprobar la integridad de los fragmentos clonados.

### 3.4. Transcripción *in vitro* de RNAs

Los plásmidos fueron linealizados mediante digestión con XhoI y usados como molde en reacciones de transcripción *in vitro* con las RNAs polimerasas de los fagos T7 o SP6 (*New England Biolabs*). Estas reacciones contenían 10 ng/ $\mu$ l de DNA molde, 1000 U/ml de RNA polimerasa T7, 1X de buffer de reacción, 1 mM de análogo de estructura Cap m7G(5')ppp(5')G (*New England Biolabs*), 0.5 mM ATP, 0.5 mM CTP, 0.5 mM UTP, 0.25 mM GTP y 0.32 U/ $\mu$ l de inhibidor de ribonucleasas RNaseOUT (*Invitrogen*), y fueron incubadas durante 4 horas a 37°C. Posteriormente se eliminó el DNA molde tratando con 0.1 U/ $\mu$ l de DNasa I Recombinante sin RNasas (*Takara*) durante 10 minutos a 37°C. La mezcla de transcripción contenía siempre el análogo de Cap m7G(5')ppp(5')G, excepto cuando se indica lo contrario en el texto, o cuando T7 Rluc  $\Delta$ EMCV IGR-Fluc y pTM1-luc fueron usados como moldes.

### 3.5. Transfección de RNAs

Los RNAs transcritos *in vitro* fueron transfectados en células usando Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) según las recomendaciones del fabricante.

### 3.6. Virus e infecciones virales

Para obtener los virus SINV wt y SINV AUG-CAA<sub>14</sub> a partir de los clones de cDNA infectivos, se transfectaron células BHK con RNAs sintetizados *in vitro* usando como molde los plásmidos linealizados pT7 SVwt o pT7 SV AUG-CAA<sub>14</sub>. Los virus se recogieron del medio de cultivo 48 horas más tarde. Las infecciones virales se llevaron a cabo en medio DMEM durante 1 hora a 37°C en células de mamífero o a 28°C en células de insecto. Seguidamente, este medio se sustituyó por DMEM suplementado con 5% ó 10% de FCS en células BHK y MEFs PKR<sup>-/-</sup>, respectivamente, o por medio M3 con 10% de FCS en células C6/36, y se continuaron las incubaciones a la temperatura correspondiente para cada línea celular. Las infecciones con SINV wt, SINV ΔDLP, SINV AUG-CAA<sub>14</sub>, VSV y EMCV se realizaron a una multiplicidad de 5 unidades formadoras de placa (ufp) por célula.

### 3.7. Traducción *in vitro*

La traducción en extractos celulares de mamífero fue llevada a cabo en lisados de reticulocitos de conejo (RRL, *rabbit reticulocyte lysates*) tratados con nucleasas, siguiendo las recomendaciones del proveedor (*Promega*). Las reacciones de traducción contenían 100 ng de RNA transcrito *in vitro* y fueron incubadas durante 90 minutos ó 2 horas a 30°C, según el experimento. Los ensayos de traducción *in vitro* en extractos de embriones de *Drosophila melanogaster* se realizaron tal y como se describió previamente [133]. En este caso, las mezclas de reacción fueron incubadas en un volumen final de 10 µl a 25°C durante 90 minutos, y contenían 200 ng de RNA sintetizado *in vitro*, 40% de extracto de embriones (cedido amablemente por F. Gebauer, Centro de Regulación Genómica, Barcelona, España), 0.1 mM de espermidina, 60 µM de aminoácidos, 16.8 mM de creatina fosfato, 80 ng/µl de creatina kinasa, 24 mM de HEPES pH 7.4, 1.4 mM de acetato de magnesio, 100 mM de acetato de potasio y 100 ng/µl de tRNA de hígado de ternera. La síntesis de proteínas se estimó midiendo actividad luciferasa o mediante marcaje radiactivo.

### 3.8. Medición de actividad luciferasa

En primer lugar, las células se lisaron en buffer de lisis, compuesto por 0.5% Tritón X-100, 25 mM glicilglicina (pH 7.8) y 1 mM ditiotreitól. Después se midió la actividad luciferasa usando el kit comercial *Luciferase Assay System* (*Promega*) y un luminómetro *Monolight 2010* (*Analytical Luminiscense Laboratory*). La cantidad total de proteína celular se estimó usando *BioRad Protein Assay Kit* (con albúmina de suero bovino como estándar de concentración de proteínas) y un espectrofotómetro *GeneQuant Pro* (*Amersham Biosciences*).

### 3.9. Marcaje radiactivo de proteínas

A los tiempos indicados, se reemplazó el medio de crecimiento de las células por DMEM sin metionina/cisteína suplementado con 11  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^{35}\text{S}$ ]Met-Cis (*EasyTag<sup>TM</sup> EXPRESS  $^{35}\text{S}$  Protein Labeling mix*, Perkin Elmer). Las células se recogieron después en buffer *sample* (0.37 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1 M DTT, 2% SDS, 17% glicerol y 0.024% azul de bromofenol), se hirvieron durante 5 minutos y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 15% y autorradiografía. La cuantificación de los geles se realizó mediante densitometría, utilizando un densitómetro calibrado GS-800 de *Bio-Rad*.

### 3.10. Inmunodetección de proteínas mediante *Western blot*

Se recogieron las células en buffer *sample*, se hirvieron las muestras durante 5 minutos y se separaron mediante SDS-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Bio-Rad*), y se procedió a realizar el *Western blot* según el protocolo detallado por E. Álvarez en su tesis doctoral [134]. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal de conejo frente al eIF2 $\alpha$  fosforilado en Ser51 a una dilución 1:1000 (*Cell Signaling Technology*), anticuerpo policlonal de conejo frente al eIF2 $\alpha$  total a dilución 1:1000 (*Santa Cruz Biotechnology*), anticuerpo policlonal de conejo frente a C de SINV [12] a 1:1000, anticuerpo policlonal de conejo frente a luciferasa (*Santa Cruz Biotechnology*) a dilución 1:1000, anticuerpos policlonales de conejo frente a las regiones N-terminal y C-terminal del eIF4GI [135] a dilución 1:1000, anticuerpo monoclonal de ratón frente al eIF4AII (*Santa Cruz Biotechnology*) a dilución 1:500, anticuerpo monoclonal de ratón frente al eIF4E (*Santa Cruz Biotechnology*) a dilución 1:500, anticuerpos policlonales de rata anti-nsP1 [107] a dilución 1:500, y anticuerpos policlonales de conejo frente a nsP2 a 1:500 (amablemente cedido por Dr. R. W. Hardy, Indiana University, EEUU). Para detectar los anticuerpos primarios se emplearon anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa: anti-inmunoglobulinas G de conejo, de ratón o de rata (*Amersham*) a una dilución 1:5000. Las bandas reactivas correspondientes a las proteínas analizadas se visualizaron con el kit comercial de detección ECL (*Amersham*) o, cuando se indica, con el reactivo de alta intensidad *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (*Thermo Scientific*).

### 3.11. Inmunofluorescencias

Los procesos de fijación, permeabilización y microscopía confocal se hicieron según la metodología descrita [136], usando una lente confocal LSM510 acoplada a un microscopio Axio Imager.Z1 de *Zeiss*. Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína C de SINV [12], anticuerpo monoclonal de ratón frente al eIF4A (cedido amablemente por el Dr. H. Trachsel,

Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University of Berne, Suiza), anticuerpo monoclonal de ratón frente al eIF4AII (*sc-137147*, *Santa Cruz Biotechnology*), anticuerpo policlonal de cabra frente al eEF2 (*sc-13003*, *Santa Cruz Biotechnology*), anticuerpo policlonal de cabra frente a TIA-1 (*sc-1751*, *Santa Cruz Biotechnology*), anticuerpo monoclonal de ratón frente al eIF4E (*sc-9976*, *Santa Cruz Biotechnology*), anticuerpo policlonal de conejo frente al eIF4GI [137], anticuerpo monoclonal de ratón frente a PABP (*Abcam*), anticuerpo policlonal de cabra frente a la subunidad p110 del eIF3 (*sc-28858*, *Santa Cruz Biotechnology*), anticuerpo policlonal de cabra frente al eIF1 (*sc-49186*, *Santa Cruz Biotechnology*). Como anticuerpos secundarios, se usaron anticuerpos específicos conjugados a Alexa 488, Alexa 555 o Alexa 647 (A-21202, A-21432 y A-31573, respectivamente, *Invitrogen*). Para visualizar los núcleos se usó el reactivo To-Pro-3 (*Invitrogen*). El procesamiento de las imágenes se realizó con el software Huygens 4.1 (*Scientific Volume Imaging B.V.*). Los coeficientes de correlación de Pearson se obtuvieron con el software *ImageJ*, usando el plug-in *JACoP* [138].

### 3.12. Predicción de estructuras secundarias de RNA

Para predecir las estructuras secundarias de energía libre mínima se usó el servidor web *RNAfold* [139], estableciendo los parámetros por defecto: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>

### 3.13. Análisis de RNAs virales

El estudio de los RNAs virales se realizó midiendo la incorporación de [ $5\text{-}^3\text{H}$ ]-uridina en los RNAs virales. Éstos se purificaron y se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa, fluorografía y autorradiografía, o bien midiendo la radiactividad incorporada en un contador de centelleo. Las cantidades de sgRNA también se cuantificaron mediante PCR cuantitativa con transcriptasa reversa (qRT-PCR). Para el análisis electroforético en geles de agarosa, se trataron aproximadamente  $2.5 \times 10^6$  células con actinomicina D a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  desde las 2 horas post-transfección (hpt), y con 40  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]-uridina desde las 3 hpt. A las 7 hpt se extrajo el RNA total usando el kit comercial *RNAeasy mini Kit* (*Qiagen*) y se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de agua. Las muestras (25  $\mu\text{l}$ ) fueron desnaturizadas con glioxal y DMSO y separadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7% conteniendo 10 mM de buffer fosfato [140]. Finalmente, los geles se secaron y se expusieron en películas de rayos X a  $-70^\circ\text{C}$ . Para el análisis por centelleo líquido, se trataron aproximadamente  $6 \times 10^5$  células con actinomicina D (5  $\mu\text{g/ml}$ ) desde las 2 hpt y con [ $^3\text{H}$ ]-uridina (40  $\mu\text{Ci/ml}$ ) desde las 4 hpt. A las 5, 7 y 9 hpt, se descartó el medio y las células fueron tratadas con ácido tricloroacético al 5%, lavadas dos veces con etanol, secadas y disueltas en 0.1 N NaOH/1% SDS. Por último, las muestras fueron analizadas en un espectrómetro de centelleo líquido. Las cantidades de sgRNA se evaluaron también mediante qRT-PCR. Para ello, a las 2 hpt se extrajo el RNA total de células BHK transfectadas, usando *RNAeasy mini Kit*. A continuación se realizó una reacción

de transcripción reversa empleando *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron sometidas posteriormente a qRT-PCR usando primers específicos frente a luciferasa (ver tabla S2) y *SsoFast EvaGreen SuperMix* (BioRad). La amplificación comenzó con la incubación durante 30 segundos a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 5 segundos, usando *CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System* (BioRad). Los valores de luciferasa fueron normalizados con un control interno de  $\beta$ -Actina. Para esta reacción se usaron primers específicos frente a  $\beta$ -Actina (ver tabla S2), *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix* (2X), *No AmpErase UNG* (Applied Biosystems) y una sonda UPL n° 20. Esta PCR se inició con la incubación a 95°C durante 20 segundos, y siguió con 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos. La especificidad de las reacciones de amplificación se confirmó mediante el examen de las curvas de *melting* correspondientes. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el software GenEx, versión 5.3.7.

### **3.14. Ensayos de inmunoprecipitación**

Tras el tratamiento con el compuesto 4EGI-1 a las concentraciones indicadas durante 90 minutos, se lavaron las células en PBS 1X y se lisaron en buffer RIPA (0.01M TrisHCl pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 0.4mM PMSF y 1% desoxicolato de sodio). Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-eIF4GI [137] a una dilución de 1:100 usando bolas magnéticas acopladas a Proteína A (*Dynabeads Protein A for Immunoprecipitation*, Invitrogen), siguiendo las directrices del fabricante.



## RESULTADOS

---



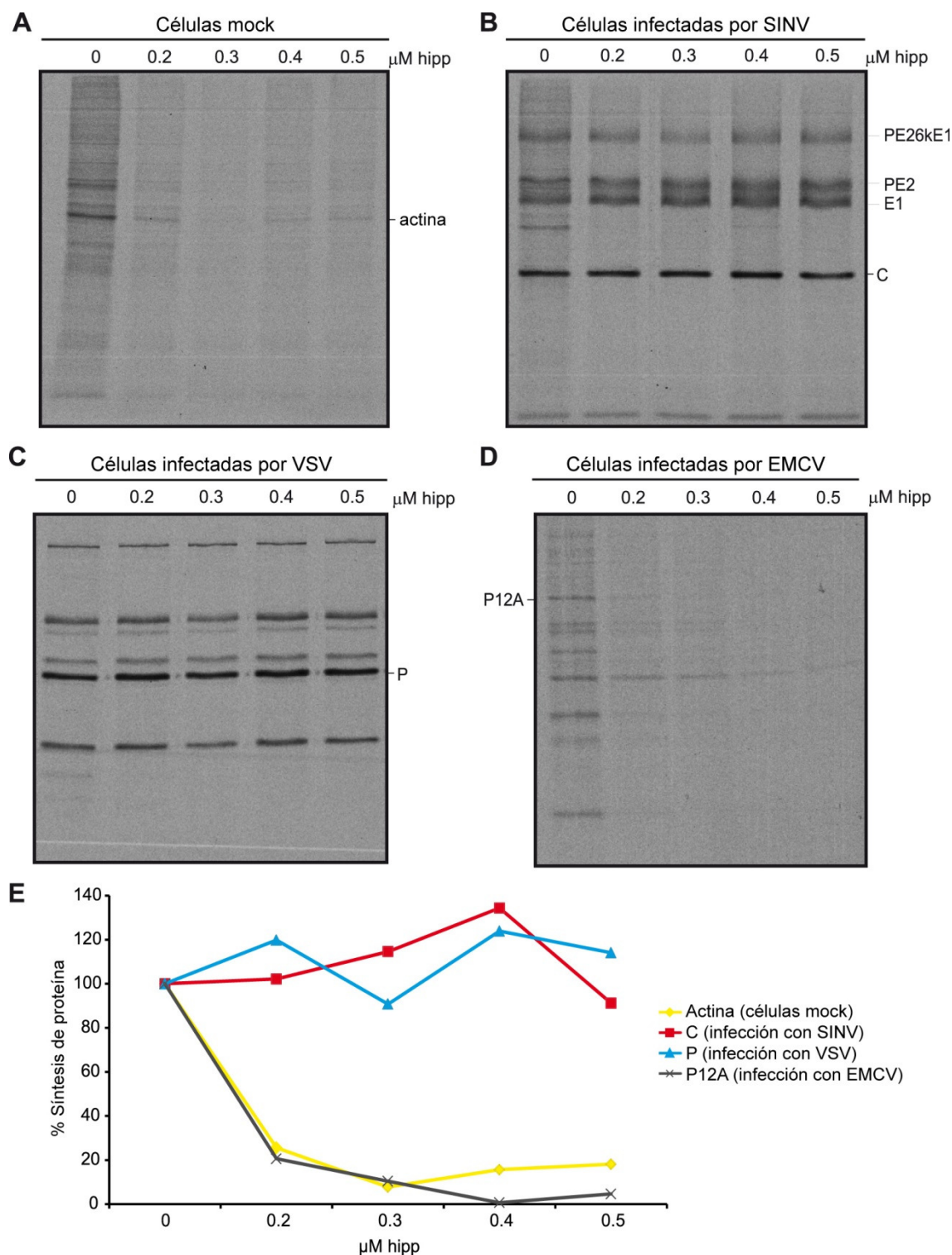


## 4. RESULTADOS

### 4.1. REQUERIMIENTO DE eIFs DURANTE LA TRADUCCIÓN DEL sgRNA DE SIN V EN LÍNEAS CELULARES DE VERTEBRADO E INVERTEBRADO

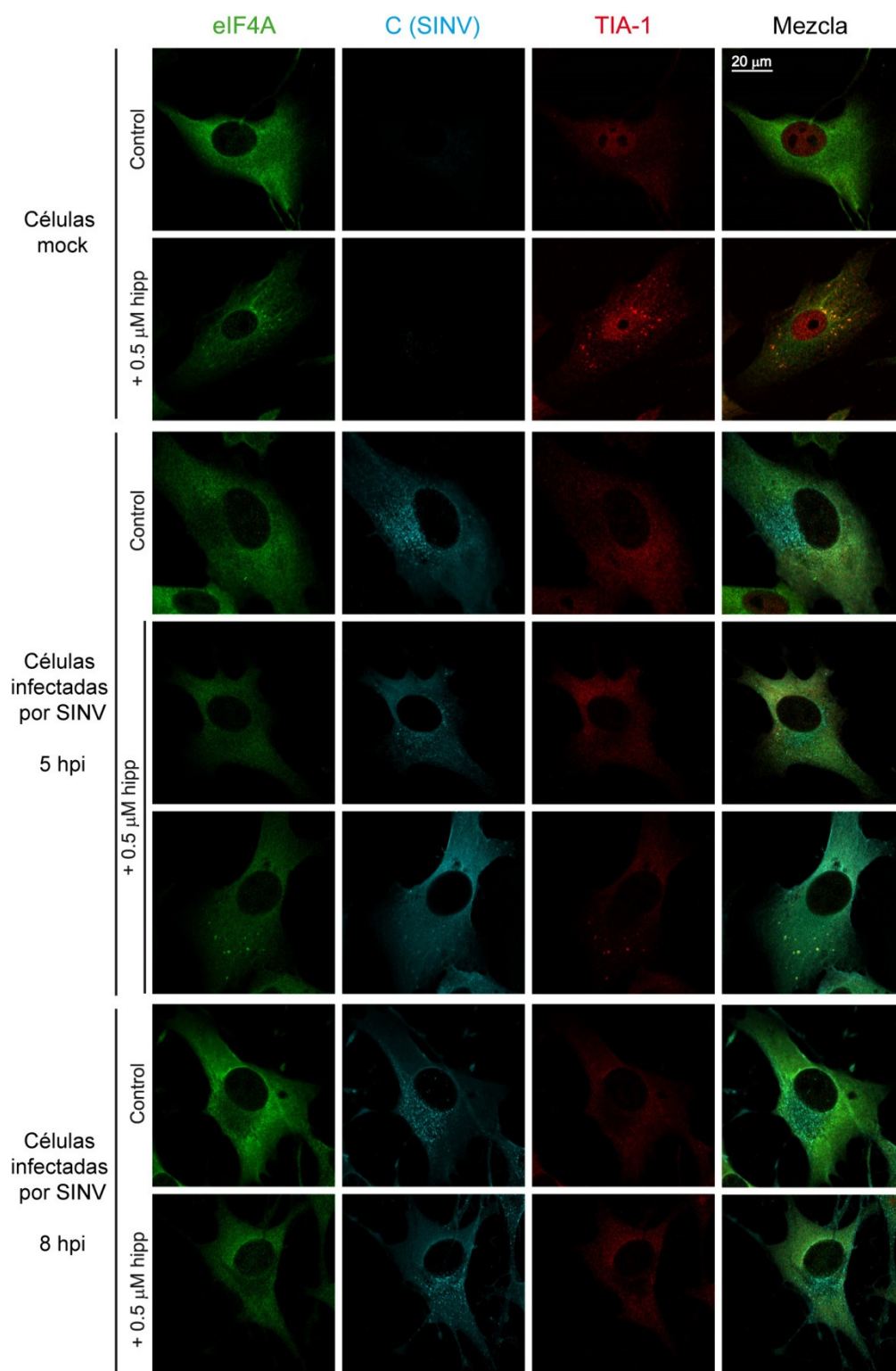
#### 4.1.1. Requerimiento del eIF4A en células infectadas por el virus

Como se ha comentado, la traducción del sgRNA de SIN V no requiere el eIF2 activo o el eIF4G intacto en células infectadas [12,20,21,100]. Particularmente, la expresión de la proteasa 2A de PV en células infectadas por SIN V corta eficientemente el eIF4G, pero la traducción del sgRNA de SIN V no se inhibe a pesar de que este mRNA está capeado en su extremo 5' [20]. Por este motivo, consideramos interesante determinar si el eIF4A, otro componente del complejo eIF4F, participa en la traducción del sgRNA de SIN V, tal y como ocurre en la mayoría de mRNAs celulares y virales. Con este fin empleamos hipuristanol (hipp), que es un inhibidor selectivo del eIF4A [141], y analizamos, en primer lugar, su efecto sobre la síntesis de proteínas celulares y virales mediante marcaje radiactivo con [<sup>35</sup>S]Metionina-Cisteína ([<sup>35</sup>S]Met-Cis). En células BHK sin infectar, concentraciones de hipp tan bajas como 0.3 μM bloquean drásticamente (~90%) la traducción de los mRNAs celulares (Figuras 3A y 3E). Este resultado indica que los mRNAs celulares utilizan el eIF4A, y si este factor es bloqueado, no puede ser reemplazado por otras helicasas celulares para restaurar la traducción [15]. En cambio, la presencia de hipp no tiene efectos inhibitorios en la traducción del sgRNA de SIN V, como se puede apreciar por la cantidad de proteína C y glicoproteínas sintetizadas (Figuras 3B y 3E), incluso a concentraciones de 0.5 μM. Como control experimental decidimos examinar el efecto del hipp sobre la traducción de mRNAs de otros virus, en concreto el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus de la encefalomiocarditis (EMCV). VSV muestra un comportamiento análogo a SIN V (Figuras 3C y 3E), de acuerdo con el hecho de que la traducción de estos mRNAs no requiere el eIF4E ni el eIF4G [142,143]. En el caso de EMCV se observa una inhibición de la síntesis de proteínas virales del 90% aproximadamente en presencia de 0.3 μM de hipp (Figuras 3D y 3E). Esta observación concuerda con la capacidad del hipp para bloquear la traducción dirigida por los IRES de picornavirus [141,144]. Nuestros resultados demuestran que el eIF4A no es necesario para traducir el sgRNA de SIN V o los mRNAs de VSV, por lo que parece poco probable que cualquiera de los tres componentes del complejo eIF4F participen en la síntesis de proteínas de SIN V o VSV a tiempos tardíos de la infección. Además, existe un fuerte contraste entre el efecto causado por el hipp en células infectadas por SIN V o VSV en comparación con las células control o infectadas por EMCV, donde se inhibe claramente la traducción en presencia del compuesto.



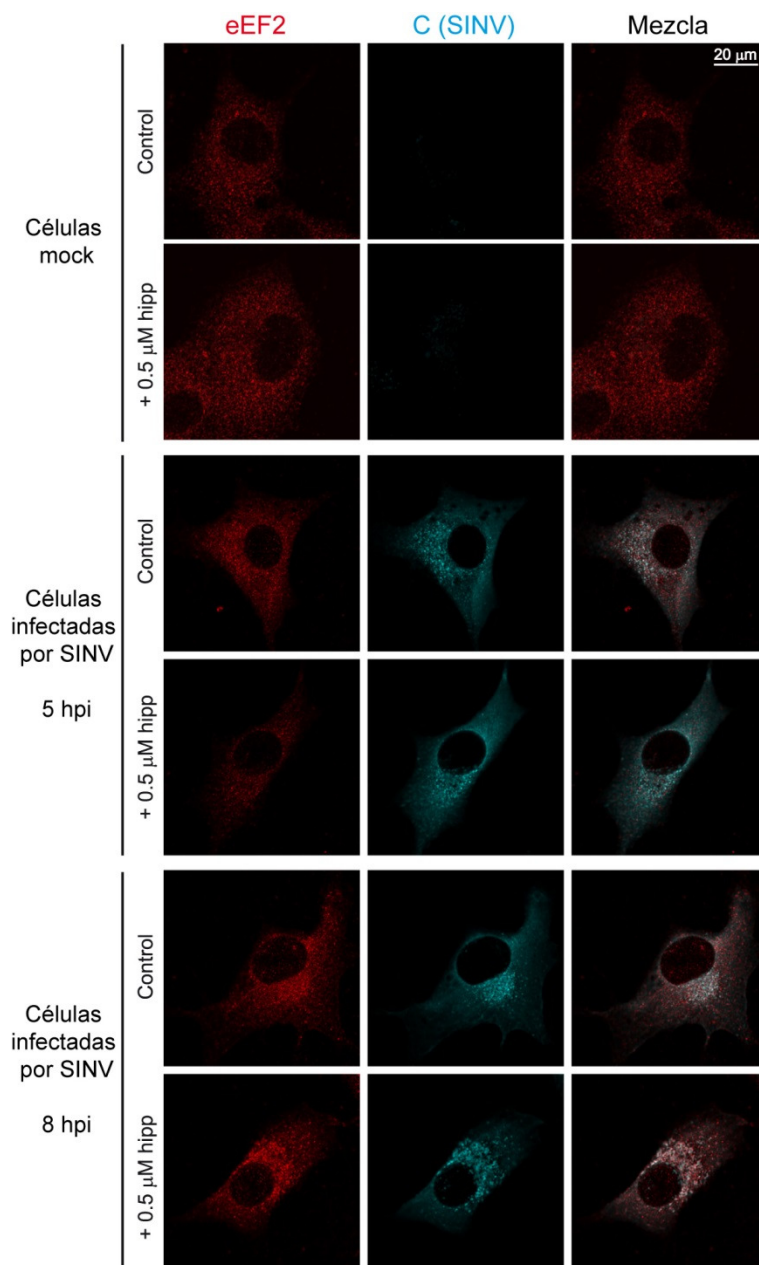
**Figura 3. Efecto del hipp en la traducción en células BHK infectadas por virus.** A-D) Se infectaron células BHK con SINV (B), VSV (C) o EMCV (D) a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula, o se dejaron sin infectar (células mock) (A). A las 5.5 hpi (ó 4.5 hpi en el caso de EMCV), las células se trataron con hipp a las concentraciones indicadas durante 30 minutos. De 6 a 7 hpi (de 5 a 6 hpi en el caso de EMCV), los cultivos celulares fueron marcados con [ $^{35}\text{S}$ ]Met-Cis en ausencia o presencia del inhibidor a las mismas concentraciones que antes. Las proteínas marcadas radiactivamente fueron separadas mediante SDS-PAGE, seguido de autorradiografía. E) Se calculó el porcentaje de síntesis de proteínas virales y celulares en células tratadas con hipp en comparación con las células sin tratar, a partir de los valores obtenidos mediante densitometría. Las bandas analizadas fueron: actina (células mock), C (células infectadas con SINV), P (células infectadas con VSV) y P12A (células infectadas con EMCV).

Para estudiar más a fondo la posible exclusión del eIF4A de la traducción del sgmRNA de SINV, decidimos analizar la localización subcelular de este factor en la fase tardía de la infección mediante ensayos de inmunofluorescencia. Con este fin, examinamos la colocalización del eIF4A con la proteína viral C o con la proteína celular TIA-1 (antígeno intracelular de las células T) a las 5 y 8 horas post-infección (hpi) en presencia o ausencia de hipp. Se ha descrito que, en células infectadas, la proteína C aparece sobre todo en una región cercana al núcleo donde ocurre la síntesis de proteínas virales [12], presumiblemente por la interacción entre la proteína C y los ribosomas [145,146]. Por otra parte, se ha documentado que el tratamiento con hipp induce la formación de SGs en células HeLa y MEFs [147]. Además, en células infectadas por SFV se produce una relocalización de TIA-1 del núcleo al citoplasma y una inducción de SGs en los que se concentra esta proteína. No obstante, estos SGs van desapareciendo a medida que progresa la infección [99]. Tal y como se aprecia en la Figura 4, en las células BHK sin infectar TIA-1 se localiza principalmente en el núcleo, mientras que el eIF4A se sitúa en el citoplasma. La adición de 0.5  $\mu$ M hipp induce la formación de SGs en los que se agrega cierta cantidad de TIA-1 y del eIF4A. Esto podría indicar que la inhibición de la traducción causada por el hipp puede deberse, al menos parcialmente, al secuestro de una fracción del eIF4A en SGs, aunque una gran parte de este factor permanece aún libre en el citoplasma. En nuestras condiciones experimentales no observamos la formación de SGs en células infectadas, y sólo un pequeño porcentaje de las células infectadas y tratadas con hipp (alrededor del 8%) contiene SGs a las 5 hpi (Figura 4). Como consecuencia, se observan dos patrones diferentes de distribución del eIF4A y TIA-1 a este tiempo. En uno de estos patrones, TIA-1 sale del núcleo y aparece sobre todo en SGs pero también en el citoplasma. El eIF4A está presente tanto en el citoplasma como en SGs junto a TIA-1, mientras que la proteína viral C se encuentra en el citoplasma, repartida de forma difusa. Sin embargo, la mayor parte de las células infectadas tratadas con hipp no contiene SGs (Figura 4). En este último caso, el eIF4A está distribuido por el citoplasma, pero su acumulación es menor en las regiones donde tiene lugar la traducción (Figura 4). Se observa un patrón similar a las 8 hpi, independientemente de si las células han sido tratadas o no con hipp ya que, a este tiempo, los SGs dejaban de ensamblarse. Para evaluar con más precisión el grado de colocalización del eIF4A y la proteína C de SINV, empleamos el plugin JaCoP (*Just Another Colocalization Plugin*) del programa ImageJ que proporciona el coeficiente de correlación de Pearson, en el que valores superiores a 0.5 indican colocalización [138]. En células infectadas con SINV, el coeficiente Pearson para el eIF4A y C es de 0.34, lo que significa que no hay colocalización entre estas dos proteínas. Esto sugiere que el eIF4A, por tanto, podría no estar involucrado en la traducción del sgmRNA viral.



**Figura 4. Localización subcelular del eIF4A, la proteína C de SINV y TIA-1 en células BHK control e infectadas con SINV, en presencia o ausencia de hipp.** Se sembraron células BHK en cubreobjetos de cristal y se infectaron con SINV (5 ufp/célula) o se dejaron sin infectar (mock). A las 3.5 ó 6.5 hpi, las células fueron tratadas con 0.5  $\mu$ M de hipp o se dejaron sin tratar, durante 90 minutos. A las 5 u 8 hpi, respectivamente, las células fueron fijadas, permeabilizadas y procesadas para inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-eIF4A (verde), anti-proteína C de SINV (cian) o anti-TIA-1 (rojo). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal y procesadas con el software Huygens 4.1. La mezcla de las imágenes representa la visualización simultánea del eIF4A, C y TIA-1.

Para asegurarnos de que la ubicación de la proteína viral C es un buen indicador de los lugares donde ocurre la síntesis de proteínas virales, estudiamos su colocalización con el factor de elongación de la traducción eEF2. En células control sin infectar, el eEF2 se esparce por todo el citoplasma, incluso cuando las células BHK han sido tratadas con 0.5  $\mu\text{M}$  hipp (Figura 5), lo que indica que el eEF2 no se redistribuye en SGs después del tratamiento con el compuesto. Además, en células infectadas por SINV, la proteína C colocaliza con el eEF2, obteniéndose un coeficiente de correlación de Pearson de 0.72. Esto confirma que, efectivamente, C es un buen marcador de los sitios donde se está llevando a cabo la traducción viral.



**Figura 5. Localización subcelular del eEF2 y de la proteína C de SINV en células BHK control e infectadas con SINV.** Se infectaron células BHK con SINV (5 ufp/célula) o se dejaron sin infectar (mock). A las 3.5 ó 6.5 hpi se trataron las células durante 90 minutos con 0.5  $\mu\text{M}$  de hipp, o se dejaron sin tratar. A las 5 u 8 hpi se fijaron las células, se permeabilizaron y se procesaron para inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-eEF2 (rojo) y anti-proteína C de SINV (cian). Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal y fueron procesadas a continuación con el software Huygens 4.1. La mezcla de las imágenes representa la visualización dual de eEF2 y C.

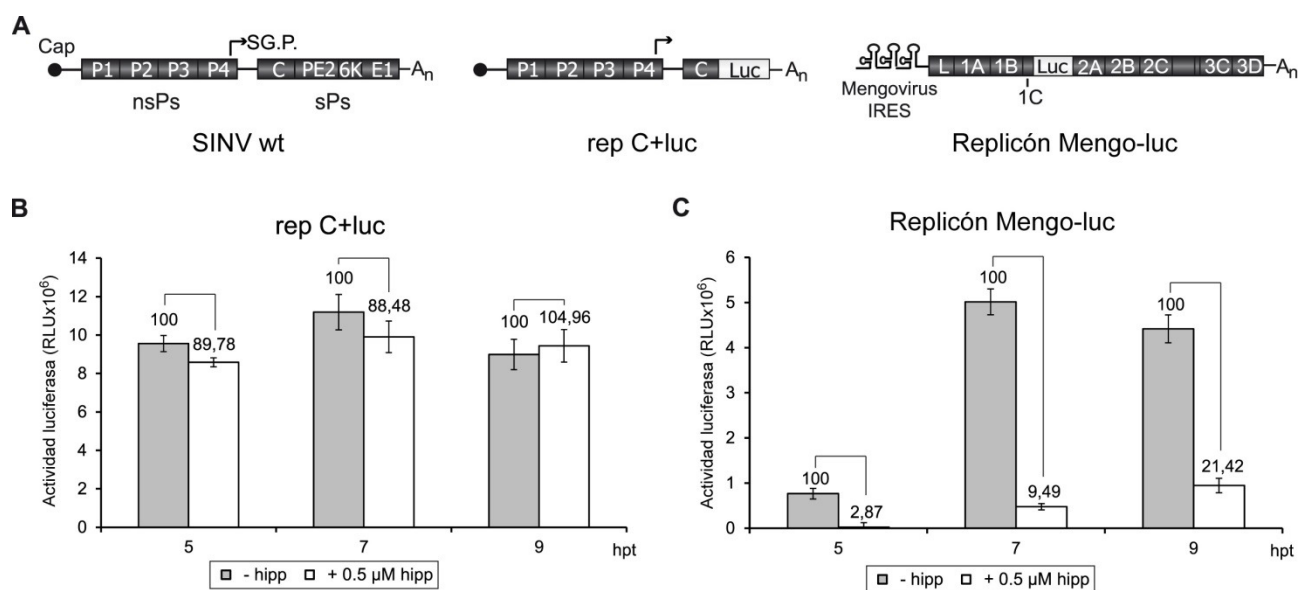
#### **4.1.2. Participación del eIF4A en la traducción del sgRNA de SINV producido a partir de diferentes replicones**

Una posibilidad a tener en cuenta para la no participación del eIF4A en la traducción del sgRNA de SINV en células infectadas es que una proteína viral reemplace su función. Alternativamente, es posible que una proteína celular sustituya al eIF4A en el contexto de infección viral. Para poder distinguir entre estas dos posibilidades, utilizamos diferentes replicones de SINV que sintetizan luciferasa (luc) y permiten cuantificar con precisión la síntesis de proteínas. Estos replicones fueron transfectados en células BHK; a continuación, las células se trataron con diferentes concentraciones de hipp y se determinó la actividad luc. Además, agregamos un control de cicloheximida (CHX), que es un inhibidor de la elongación traduccional, para conocer la cantidad de luc sintetizada antes de añadir el hipp. Como control, estudiamos primero rep C+luc, que codifica para C+luc y contiene la L26S genuina seguida de las secuencias de C y luc (Figura 6A). Las células transfectadas con replicones de SINV mimetizan muchos de los eventos que ocurren en las células infectadas por el virus. De este modo, la traducción celular también es abolida y los requerimientos de ciertos eIFs para traducir el sgRNA son similares a los observados en células infectadas [12]. Por otra parte, varios laboratorios han descrito que la traducción dirigida por IRES de picornavirus es dependiente del eIF4A [144], hecho que se observa también en la figura 3D. Por tanto, pretendíamos determinar si la síntesis de proteínas dirigida por los IRES de EMCV o PV es dependiente del eIF4A en el contexto de replicación de SINV. Para ello analizamos rep LEMCV-luc o rep LPol-luc, que producen sgRNAs recombinantes con las secuencias IRES de EMCV o PV, respectivamente, las cuales dirigen la síntesis de luc (Figura 7A). No obstante, los sgRNAs de SINV que contienen IRES de picornavirus, como el de EMCV o PV, se traducen ineficientemente en ausencia de la proteasa 2A de PV [23]. Por este motivo, ambos replicones fueron cotransfectados junto a rep C+2A, para coexpresar la proteasa 2A, o con rep C+2A(G60R) para coexpresar una forma proteolíticamente inactiva de 2A.

rep C+luc da lugar a un incremento progresivo de la síntesis de luc (Figura 6B), alcanzando valores máximos a las 7 horas post-transfección (hpt). La adición de 0.5  $\mu$ M hipp a diferentes hpt no inhibe la síntesis de luc, indicando que, en este sistema, el eIF4A tampoco participa en la traducción. Como control del experimento usamos un replicón derivado de Mengovirus, con el gen luc sustituyendo a las proteínas virales estructurales (ver esquema en la Figura 6A) [148]. En este caso, el hipp sí inhibe considerablemente la síntesis de luc (Figura 6C), lo cual concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en células infectadas con EMCV (Figura 3D), que es un virus estrechamente relacionado con Mengovirus. Como se esperaba, la cotransfección de células BHK con rep LEMCV-luc o rep LPol-luc más rep C+2A(G60R) conduce a la obtención de reducidos valores de actividad luc, mientras que la cotransfección de estos replicones con rep C+2A produce unos valores de actividad luc 36 veces superiores (Figuras 7B y 7C). No obstante, en ambos casos la síntesis de luc disminuye contundentemente al añadir 0.5  $\mu$ M hipp (Figuras 7B y 7C), revelando que el eIF4A no es reemplazado por una proteína celular o de SINV en este sistema. Además, estas observaciones demuestran que la proteasa 2A de PV no confiere independencia del eIF4A, mientras



que la expresión de 2A sí promueve la traducción en ausencia del eIF2 [11]. Asimismo, el eIF4A presente en las células que expresan los replicones de SINV no se modifica o inactiva irreversiblemente, puesto que puede ser utilizado para traducir mRNAs derivados de replicones de SINV y participa en la traducción de sgRNAs con IRES de EMCV o PV. Por tanto, sólo la traducción del sgRNA genuino de SINV es independiente del eIF4A en el contexto de infección activa, mientras que la síntesis de proteínas dirigida por los IRES de picornavirus sí requiere el eIF4A.

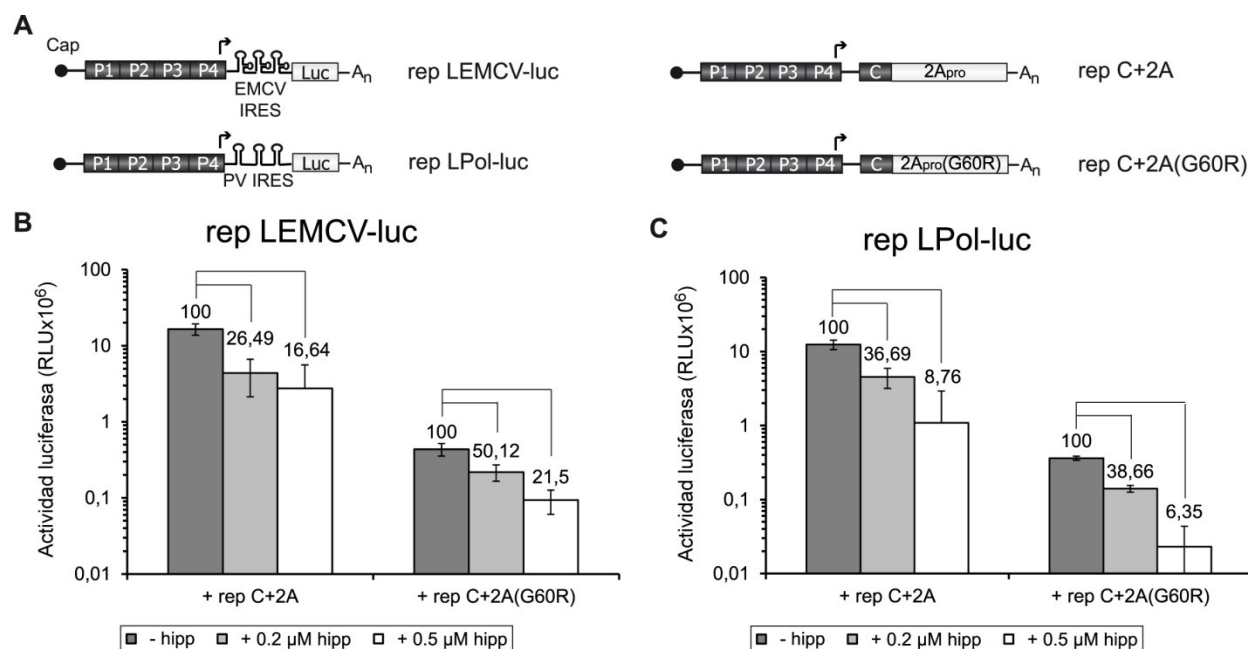


**Figura 6. Efecto del hipp en la traducción del sgRNA producido a partir de un replicón de SINV.** A) Representación esquemática de los replicones empleados. nsPs, proteínas no estructurales; sPs, proteínas estructurales; SG.P., promotor subgenómico (representado por una flecha). B-C) Se transfectaron células BHK con Lipofectamina 2000 y los mRNAs transcritos *in vitro*: rep C+luc (B) o replicón Mengo-luc (C). A las 3.5, 5.5 y 7.5 hpt las células fueron tratadas con 0.5 µM hipp ó 100 µg/ml CHX durante 90 minutos, o bien dejadas sin tratar. A los tiempos indicados, las células tratadas y sin tratar se recogieron en buffer de lisis para medir la actividad luc. Los valores obtenidos en las células tratadas con CHX se usaron para sustraer la cantidad de luc sintetizada antes de la adición de hipp. Los resultados de actividad luc se representan como la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.) de tres experimentos representativos realizados por triplicado. RLU, unidades relativas de luz. En las gráficas se muestra también la comparación entre las células tratadas con hipp y las células sin tratar, indicándose los porcentajes correspondientes sobre las barras.

#### 4.1.3. Mecanismo dual para la traducción del sgRNA de SINV con respecto al requerimiento del eIF4A

En principio, es posible que el sgRNA de SINV no necesite la actividad helicasa del eIF4A ya que contiene una región 5'-UTR corta y con poca estructura secundaria. Alternativamente, este sgRNA podría traducirse mediante mecanismos diferentes dependiendo de si el contexto celular corresponde a una infección viral por SINV o no, tal y como se ha descrito anteriormente con respecto a la utilización del eIF2 o del eIF4G [12]. Para analizar esta posibilidad, se transfectaron células BHK con mRNAs no replicativos sintetizados *in vitro* tales como sgRNA C+luc o IRES EMCV-luc (Figura 8A), y se estudió el efecto del tratamiento con hipp. Adicionalmente, también examinamos el efecto del compuesto sobre la traducción del gmRNA de SINV. Con este fin usamos una construcción que contiene el gen luc dentro de la región

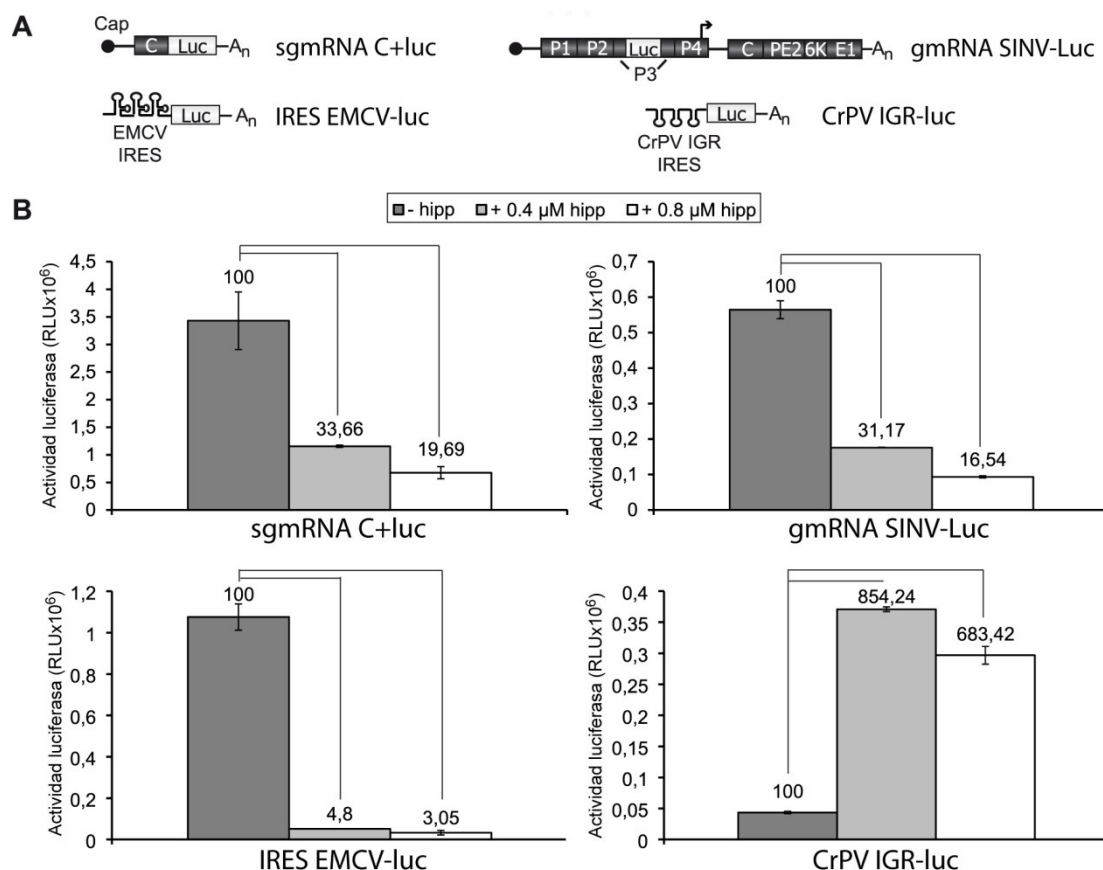
codificante para la proteína nsP3 (gmRNA SINV-Luc, ver esquema en la figura 8A), y detectamos su traducción midiendo actividad luc. Como mRNA control que no emplea el eIF4A utilizamos CrPV IGR-luc, en el que la síntesis de luc está dirigida por la secuencia IRES de la IGR de CrPV, que propicia una iniciación de la traducción sin la participación de ningún eIF.



**Figura 7. Acción de la proteasa 2A en la traducción del sgmRNA de SINV con IRES de picornavirus en células BHK tratadas con hipp.** A) Representación esquemática de los replicones empleados. La flecha indica el promotor subgenómico. B-C) Se cotransfectaron células BHK con Lipofectamina 2000 y una mezcla de mRNAs transcritos *in vitro* compuesta por rep LEMCV-luc (B) o rep LPol-luc (C) más rep C+2A o rep C+2A(G60R). A las 5.5 hpt, las células se trataron con las concentraciones indicadas de hipp o con 100 μg/ml CHX durante 90 minutos. A continuación, las células se recolectaron en buffer de lisis y se determinó la actividad luc. Los valores obtenidos en las células tratadas con CHX se usaron para restar la cantidad de luc producida antes de añadir el hipp. Los resultados se muestran como medias ± D.E. de tres experimentos diferentes realizados por triplicado, y se representan usando una escala logarítmica en el eje de ordenadas. Los porcentajes obtenidos al comparar las células tratadas con hipp y las células sin tratar se indican en la gráfica.

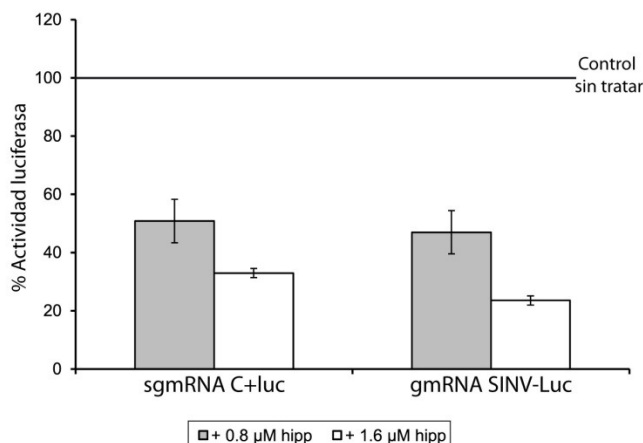
En la figura 8B se muestra como la síntesis de proteínas dirigida por el mRNA IRES EMCV-luc es sensible a la acción del hipp. La traducción del gmRNA de SINV también resulta inhibida por el hipp aunque en menor grado. Curiosamente, el hipp tiene un efecto similar sobre la traducción del sgmRNA C+luc sintetizado *in vitro*. En cambio, la traducción de CrPV IGR-luc en células BHK se estimula fuertemente en presencia hipp, tal vez debido a que este inhibidor bloquea la traducción de los mRNAs celulares. De esta manera, en presencia de hipp dejaría de existir una competencia entre el mRNA CrPV IGR-luc y los mRNAs celulares por los componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas. Además, este dato indica claramente que el hipp no produce efectos perjudiciales en otras etapas de la traducción, aparte de la iniciación. Estas observaciones muestran que, a diferencia de lo que ocurre en células infectadas (Figura 3), el sgmRNA de SINV sí requiere el eIF4A para traducirse eficientemente tras ser transfectado en células BHK.





**Figura 8. Transfección de células BHK con mRNAs sintetizados *in vitro*. Efecto del tratamiento con hipp.** A) Representación esquemática de los mRNAs empleados. B) Se sintetizaron los siguientes mRNAs mediante transcripción *in vitro* usando la RNA polimerasa T7: sgmRNA C+Luc, gmRNA SINV-Luc, IRES EMCV-luc y CrPV IGR-luc. Seguidamente se transfectaron en células BHK empleando Lipofectamina 2000. Después de 30 minutos se añadieron diferentes cantidades de hipp (0, 0.4 y 0.8 μM) ó 100 μg/ml de CHX y se incubaron las células durante 90 minutos antes de recogerlas para analizar la actividad luc. Los valores obtenidos en las células tratadas con CHX fueron usados para sustraer la cantidad de luc sintetizada antes del tratamiento con hipp. Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de tres experimentos independientes hechos por triplicado. En la figura se indican los porcentajes obtenidos al comparar las células tratadas con hipp y las respectivas muestras sin tratar.

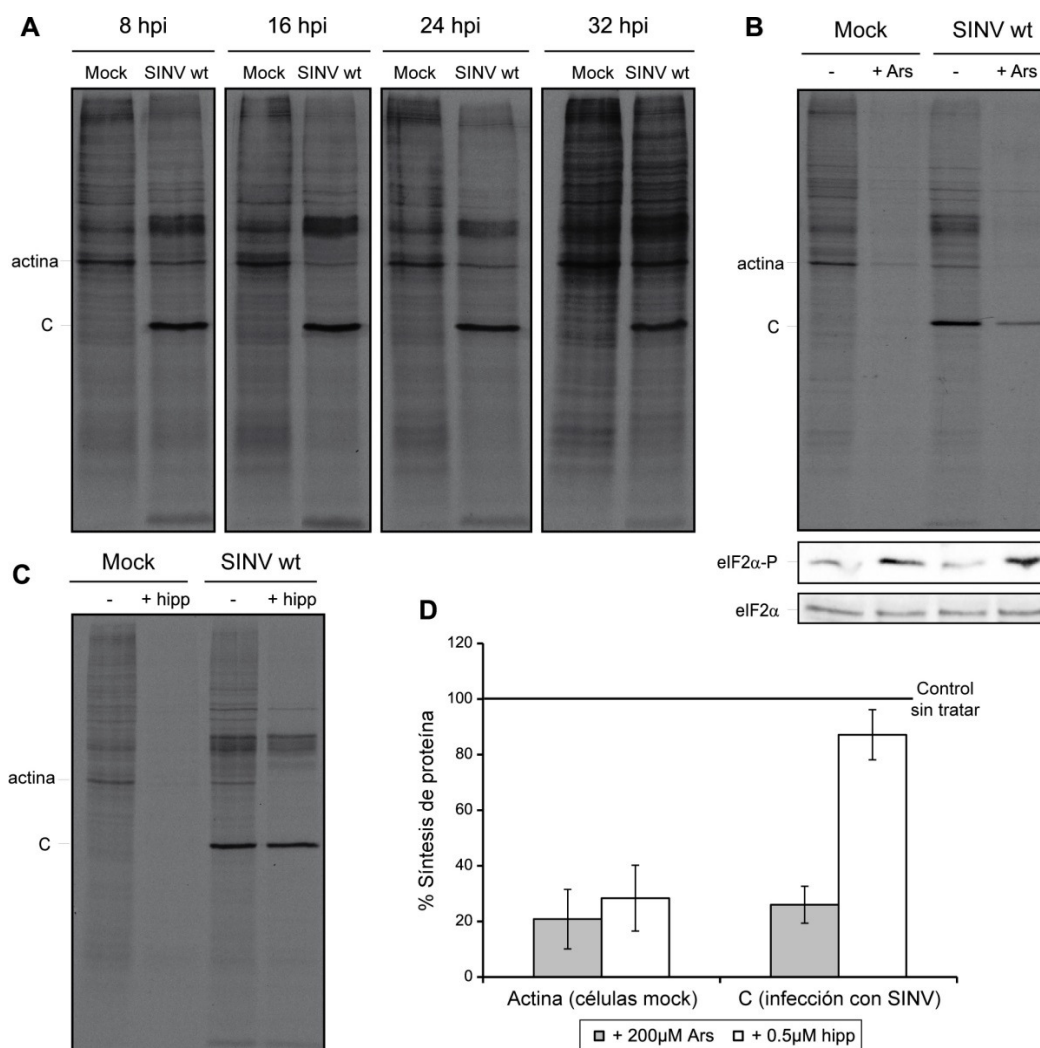
En sistemas reconstituidos *in vitro* se ha descrito que el sgmRNA de SINV puede traducirse en presencia únicamente del eIF2D (o MCT-1/DENR), DHX29 y eIF3 [13], pero nuestros resultados de la figura 8B sugieren que, en células transfectadas con el sgmRNA, no ocurre lo mismo. Por tanto, a continuación analizamos la participación del eIF4A en la traducción del sgmRNA (y también del gmRNA) de SINV en sistemas libres de células (reticulocitos de conejo, RRL). En concordancia con lo observado en células transfectadas, la síntesis de luc a partir de estos dos mRNAs se inhibe en presencia de hipp (Figura 9), lo que indica que ambos mRNAs (genómico y subgenómico) necesitan el eIF4A para traducirse eficientemente en RRLs. Como conclusión, podemos decir que ciertos eIFs son necesarios para iniciar la traducción del sgmRNA en sistemas libres de células o en células transfectadas pero no en células infectadas por el virus en condiciones fisiológicas. De este modo, el sgmRNA de SINV pone de manifiesto un mecanismo dual para su traducción con respecto a la utilización del eIF4A.



**Figura 9. Traducción *in vitro* en RRL de los mRNAs de SINV. Efecto del tratamiento con hipp.** Se sintetizaron *in vitro* sgmRNA C+Luc y gmRNA SINV-Luc con la RNA polimerasa T7. Después se añadieron 100 ng de RNA y diferentes concentraciones de hipp (0, 0.8 y 1.6 µM) a los RRL, que se incubaron posteriormente durante 90 minutos a 30°C. Finalmente, se estimó la actividad luc. En la figura se representan los valores porcentuales de actividad luc en las muestras tratadas con hipp en relación a las respectivas muestras sin tratar; los resultados son la media ± D.E. de tres experimentos representativos.

#### 4.1.4. Funcionamiento de eIFs en células de mosquito infectadas por SINV

Actualmente se conoce muy poco sobre la participación de eIFs en la traducción del sgmRNA de SINV en células de mosquito. Por tanto, nos pareció interesante examinar dos eIFs clave, como son el eIF2 y el eIF4A, en la traducción del sgmRNA de SINV en células C6/36 de *Aedes albopictus*. Para ello, infectamos células de insecto con SINV y las tratamos con arsenito sódico (Ars) para inducir la fosforilación del eIF2α [12,22], o con hipp para inactivar el eIF4A; a continuación marcamos las proteínas sintetizadas *de novo* con [<sup>35</sup>S]Met-Cis. En el panel A de la figura 10 se muestra la cinética que sigue la síntesis de proteínas celulares y virales en esta línea celular en ausencia de compuestos (Figura 10). Como se puede apreciar, hay una ineficiente inhibición de la síntesis de proteínas celulares en las células infectadas por el virus, de manera que la traducción viral coexiste con la celular durante varias horas e incluso días, tal y como se había descrito previamente [110]. Para analizar la participación del eIF2, tratamos las células con 200 µM de Ars para inducir su fosforilación y realizamos un marcaje con [<sup>35</sup>S]Met-Cis (Figura 10B). Sorprendentemente, en esta línea, la traducción del sgmRNA de SINV se inhibe considerablemente, al igual que la síntesis de proteínas celulares (Figuras 10 B y 10D). Este resultado difiere de lo observado en células de mamífero por varios laboratorios [12,21,99,100]. Otra diferencia importante encontrada en células de mosquito es que la infección con SINV no induce la fosforilación del eIF2α (Figura 10B, panel central). Este resultado podría deberse a que las células de insecto no codifican ningún ortólogo del gen de PKR presente en vertebrados [113]. En lo que respecta al hipp (Figuras 10C y 10D), su administración bloquea potentemente la síntesis de proteínas celulares, indicando que el eIF4A de estas células también es sensible al compuesto. Sin embargo, al igual que ocurre en células BHK, la traducción del sgmRNA de SINV es resistente al tratamiento con hipp. Esto sugiere que el eIF4A, y seguramente todo el complejo eIF4F, no participa en la traducción de este mRNA viral. En conclusión, el mecanismo de traducción del sgmRNA exhibe diferencias o similitudes entre células de mosquito y vertebrado con respecto al requerimiento de ciertos eIFs. Una diferencia importante es que en células de mosquito la traducción del sgmRNA requiere el eIF2 y en células de mamífero no, mientras que el eIF4A puede considerarse prescindible en ambos tipos celulares en el contexto de infección.

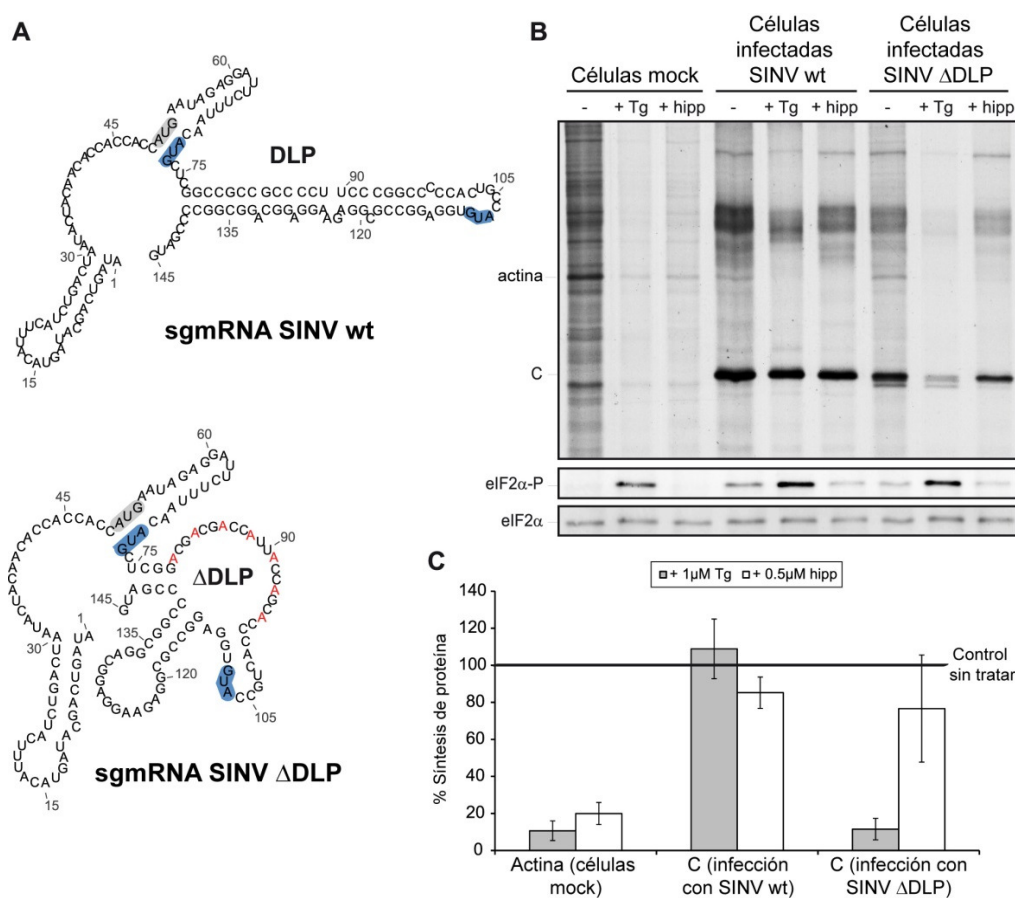


**Figura 10. Infección de células de insecto con SINV: efecto del tratamiento con Ars o hipp.** A) Se infectaron células C6/36 con SINV a 5 ufp/célula o se dejaron sin infectar (mock). Se determinó la síntesis de proteínas mediante marcaje radiactivo con [ $^{35}$ S]Met-Cis durante 1 hora a los tiempos indicados. Las muestras fueron procesadas mediante SDS-PAGE y autorradiografía. B) Se infectaron células C6/36 tal y como se describe en (A). A las 15 hpi se trataron las células con 200  $\mu$ M Ars durante 15 minutos o se dejaron sin tratar, y después se marcaron durante 45 minutos con [ $^{35}$ S]Met-Cis en ausencia o presencia del compuesto. Las muestras se procesaron por SDS-PAGE y autorradiografía (panel superior). También se analizó mediante *Western blot* el eIF2 $\alpha$  fosforilado (panel central) y el eIF2 $\alpha$  total (panel inferior) usando anticuerpos específicos. C) Se infectaron células de insecto como en (A). A las 14.5 hpi se trataron con 0.5  $\mu$ M hipp durante 30 minutos o se dejaron sin tratar. De 15 a 16 hpi se marcaron los cultivos con [ $^{35}$ S]Met-Cis en ausencia o presencia del inhibidor. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE, seguido de autorradiografía. D) El porcentaje de síntesis de actina y C en células tratadas con Ars o hipp en comparación con células sin tratar se calculó a partir de los valores obtenidos mediante densitometría de las bandas de los experimentos B y C. Los valores se muestran como la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

#### 4.1.5. Análisis de la capacidad de la estructura DLP para conferir independencia de eIFs

Se ha descrito que la estructura DLP potencia la traducción del sgRNA de SINV en células de mamífero porque su integridad es crucial para traducir este mRNA tras la fosforilación del eIF2 $\alpha$  [21,99]. Para determinar si esta estructura también confiere independencia del eIF4A, analizamos mediante marcaje radiactivo el efecto del hipp sobre la síntesis de proteína virales en células MEFs PKR $^{-/-}$  infectadas con una variante de SINV en la que se ha desestructurado la horquilla DLP. Elegimos esta línea celular porque en ella

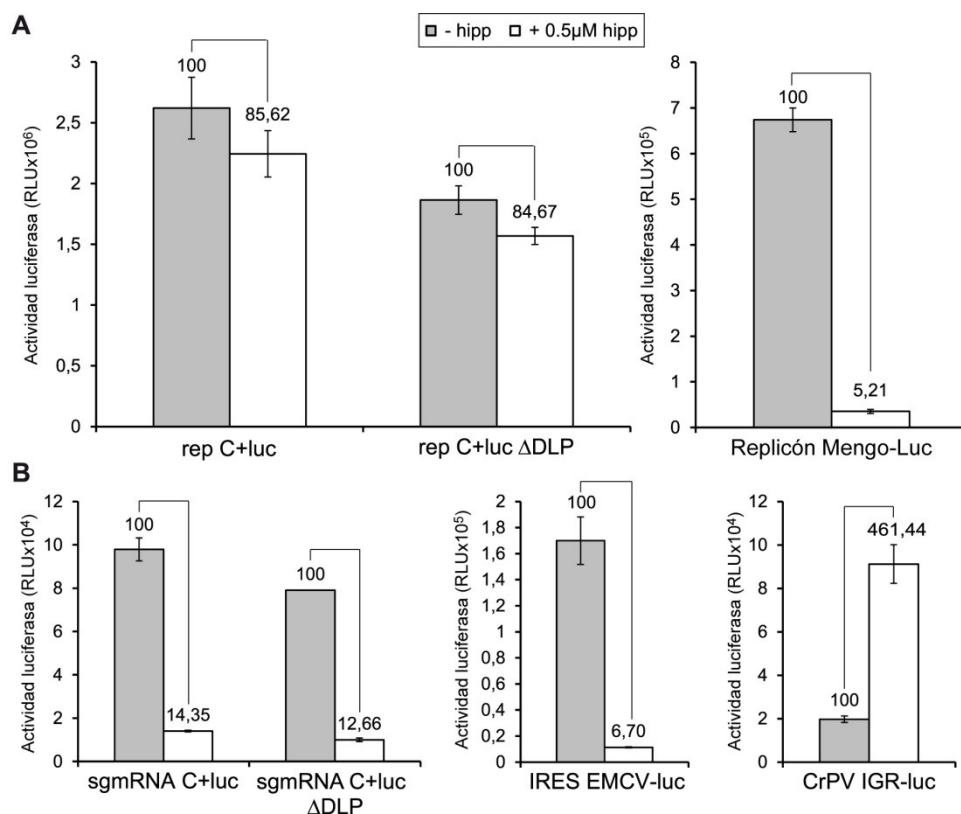
la variante  $\Delta$ DLP (Figura 11A) replica y produce proteínas virales en cantidades similares al virus wt (SINV wt, Figura 11B). Aunque en esta línea la infección no induce apenas la fosforilación del eIF2 $\alpha$ , esto se puede conseguir añadiendo tapsigargina (Tg). Como se puede apreciar en la figura, la Tg inhibe la traducción viral únicamente en las células infectadas con SINV  $\Delta$ DLP (Figuras 11B y 11C), en concordancia con los artículos citados. Esto indica que, efectivamente, el sgRNA de SINV  $\Delta$ DLP requiere el eIF2 para su traducción, y que la integridad del elemento DLP es responsable de la traducción independiente del eIF2 en MEFs PKR $^{-/-}$ . En cambio, el tratamiento con 0.5  $\mu$ M hipp tiene muy poco efecto sobre la síntesis de proteínas virales, tanto de SINV wt (~15%) como de SINV  $\Delta$ DLP (~25%), lo que sugiere que la horquilla DLP no es la responsable de conferir independencia del eIF4A.



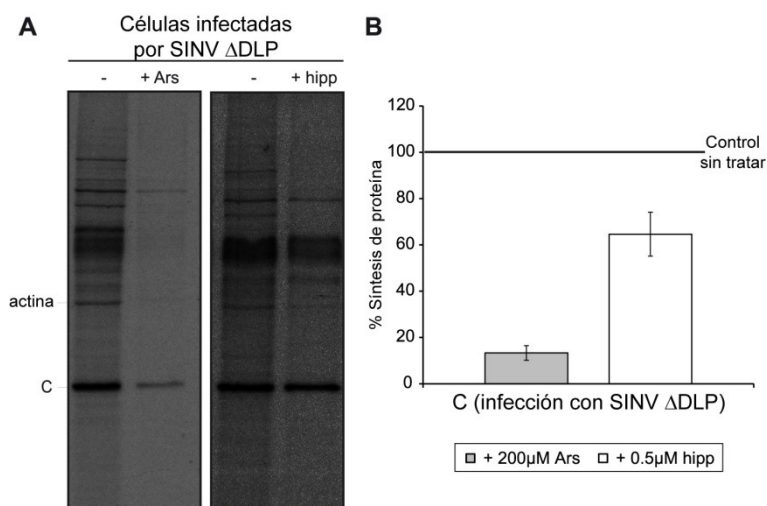
**Figura 11. Análisis de la estructura DLP presente en el sgRNA de SINV en células MEFs PKR $^{-/-}$  tratadas con Tg o hipp.** A) Representación esquemática del extremo 5' del sgRNA de SINV (wt, panel superior; mutante  $\Delta$ DLP, panel inferior) que incluye la L26S y la estructura DLP posterior al AUGi. Se muestra la predicción de la estructura secundaria hecha con el programa *RNAfold*. El codón de iniciación AUG de la posición 50 se resalta en gris y los AUGs de las posiciones 71 y 107 en azul. Los nucleótidos mutados en la variante  $\Delta$ DLP se destacan en rojo. B) Células MEFs PKR $^{-/-}$  fueron infectadas con SINV wt o  $\Delta$ DLP a una multiplicidad de 5 ufp/célula. A las 4.5 hpi se trataron las células con 1  $\mu$ M Tg o 0.5  $\mu$ M hipp durante 30 minutos, o se dejaron sin tratar. De 5 a 6 hpi, los cultivos fueron marcados con [ $^{35}$ S]Met-Cis en ausencia o presencia de los inhibidores correspondientes a las mismas concentraciones que antes. Las muestras fueron procesadas posteriormente mediante SDS-PAGE y autorradiografía (panel superior). En paralelo, se detectaron mediante *Western blot* el eIF2 $\alpha$  fosforilado (panel central) y el eIF2 $\alpha$  total (panel inferior) usando anticuerpos específicos. C) El porcentaje de síntesis de actina y C en células tratadas con Tg o hipp en comparación con las células sin tratar se calculó a partir de los valores densitométricos de las bandas correspondientes, y se representa como la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes hechos por triplicado.

Se ha descrito que tanto la estructura como el contexto en el cual tiene lugar la traducción del sgRNA de SINV son importantes para determinar el modo de iniciación de la traducción [12]. Para investigar con más detalle la actividad de la estructura DLP en la traducción del sgRNA, estudiamos su funcionamiento fuera del contexto de infección. Para ello usamos sgRNAs C+luc sintetizados *in vitro*, genuinos o con la horquilla DLP desestructurada, que pueden ser transfectados en MEFs PKR<sup>-/-</sup> para estimar la actividad luc en presencia o ausencia de hipp. Previamente, realizamos un experimento control con replicones para comprobar que dichos sgRNAs, cuando son producidos por la maquinaria de transcripción viral, son insensibles al hipp tal y como ocurre en las infecciones. Con este fin construimos un replicón mutante con el elemento DLP desorganizado (rep C+luc ΔDLP). La transfección de MEFs PKR<sup>-/-</sup> con rep C+luc ΔDLP da lugar a valores de luc ligeramente inferiores a los de rep C+luc (Figura 12A), lo que indica que la estructura DLP no estimula la traducción en células que carecen de PKR. El tratamiento con 0.5 μM hipp inhibe muy levemente la síntesis de luc a partir de rep C+luc (14% de inhibición) o rep C+luc ΔDLP (16% inhibición). Por lo tanto, estos replicones se comportan igual que los virus en lo que respecta al tratamiento con hipp. Seguidamente analizamos el comportamiento del sgRNA C+luc y del sgRNA C+luc ΔDLP en presencia de hipp, cuando son producidos *in vitro* (Figura 12B). En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente (Figura 8B), el hipp bloquea (inhibición del 86%) la traducción del sgRNA C+luc control en MEFs PKR<sup>-/-</sup> y también inhibe en la misma medida (87%) la síntesis de luc dirigida por el sgRNA C+luc ΔDLP. Nuestros resultados también indican que la horquilla DLP no estimula la traducción en MEFs PKR<sup>-/-</sup>, con independencia de la existencia de replicación viral (comparar los mRNAs wt y ΔDLP en las figuras 12A y 12B), o en células de mosquito (ver más abajo). De este modo, la estructura DLP no es un potenciador traduccional *sensu stricto*; en su lugar, este elemento debería ser considerado como un motivo que confiere independencia del eIF2 para la traducción del sgRNA en células de mamífero infectadas por SINV.

Como se ha descrito antes, la estructura DLP es responsable de propiciar una traducción independiente del eIF2 en células de mamífero, pero se desconoce su función en células de insecto en las que no existe fosforilación del eIF2α. Para conocer mejor el comportamiento del sgRNA de SINV sin DLP en estas células, las infectamos con SINV ΔDLP y examinamos el efecto del Ars y del hipp sobre la traducción del sgRNA mediante un marcaje radiactivo con [<sup>35</sup>S]Met-Cis a las 16 hpi. Se puede apreciar en la figura 13 que el sgRNA de SINV ΔDLP es sensible al tratamiento con Ars pero no al tratamiento con hipp, al igual que ocurría con el sgRNA de SINV wt (Figura 10). De este modo, la iniciación de la traducción del sgRNA necesita el eIF2 activo y, por tanto, la estructura DLP no es funcional en células de mosquito. Como conclusión final, la acción de esta horquilla en traducción es dependiente de la célula huésped.



**Figura 12. Síntesis de proteínas a partir de sgRNAs con el elemento DLP desestructurado en MEFs PKR<sup>-/-</sup> tratadas con hipp.** A) Se transfectaron células MEFs PKR<sup>-/-</sup> con Lipofectamina 2000 y los siguientes mRNAs: rep C+luc, rep C+luc ΔDLP o replicón Mengo-Luc. A las 3.5 hpt, se trataron las células con 0.5 μM hipp ó 100 μg/ml CHX durante 90 minutos, o se dejaron sin tratar. A las 5 hpt se recogieron las células en buffer de lisis y se midió la actividad luc. B) sgRNA C+luc, sgRNA C+luc ΔDLP, IRES EMCV-luc y CrPV IGR-luc fueron sintetizados *in vitro* usando la RNA polimerasa T7 y transfectados en células MEFs PKR<sup>-/-</sup> con Lipofectamina 2000. 30 minutos después se añadieron 0.5 μM hipp ó 100 μg/ml CHX, se incubaron las células durante 90 minutos más y luego se procesaron para analizar la actividad luc. En A y en B, los valores obtenidos en las células tratadas con CHX indicaban la cantidad de luc sintetizada antes de la adición del hipp. Los resultados de actividad luc se muestran como la media ± D.E. de tres experimentos representativos. En la figura se incluye también la comparación entre las células tratadas con hipp y los respectivos controles sin tratar en forma de porcentajes.



**Figura 13. Análisis de la estructura DLP en células C6/36 infectadas y tratadas con Ars o hipp.**

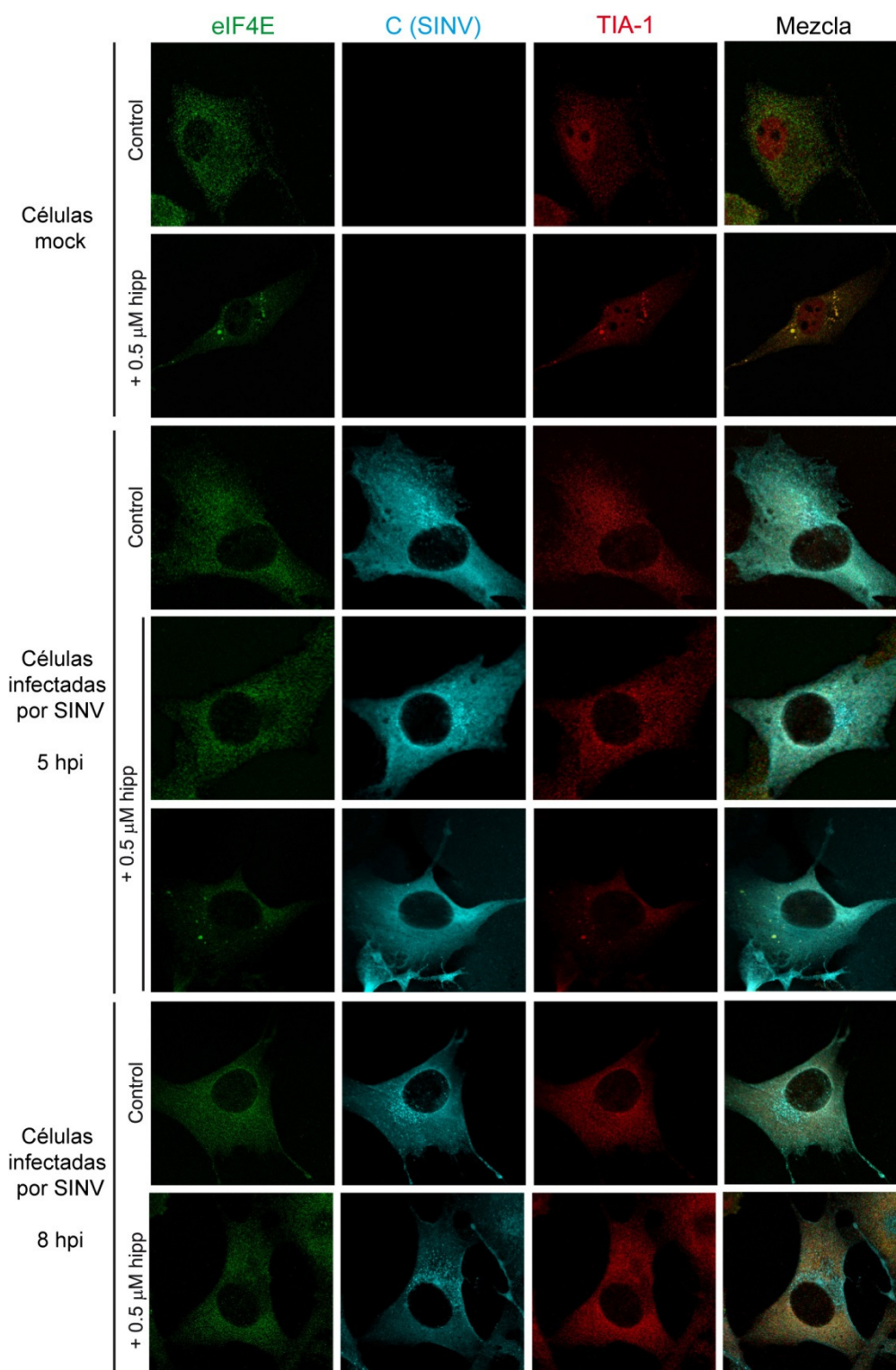
A) Se infectaron células C6/36 con SINV ΔDLP (5 ufp/célula). A las 15 hpi, los cultivos se trataron con 0 ó 200 μM Ars durante 15 minutos y se marcaron durante 45 minutos con [<sup>35</sup>S]Met-Cis en ausencia o presencia del compuesto (panel izquierdo). En paralelo, se trataron las células a las 14.5 hpi con 0 ó 0.5 μM hipp y se marcaron con [<sup>35</sup>S]Met-Cis de 15 a 16 hpi en ausencia o presencia del inhibidor (panel derecho). Las proteínas marcadas se separaron por SDS-PAGE, seguido por autorradiografía. B) El porcentaje de síntesis de C en células tratadas con Ars o hipp en comparación con las células sin tratar se calculó a partir de los valores obtenidos por densitometría.

#### 4.1.6. Implicación de otros eIFs en la traducción del sgRNA de SINV

Hasta ahora se había descrito que la traducción del sgRNA de SINV no requiere el eIF2 activo o el eIF4G intacto en células infectadas [12,20,21,100], y en el presente trabajo hemos demostrado que la subunidad eIF4A tampoco es imprescindible. El tercer componente del complejo eIF4F es el eIF4E, que está implicado en la interacción con la estructura cap de los mRNAs. Puesto que el sgRNA de SINV está capeado, nos pareció interesante analizar la localización del eIF4E en células infectadas por SINV mediante ensayos de inmunofluorescencia. Con este objetivo, infectamos células BHK con SINV, y a las 5 y 8 hpi fijamos las células y las incubamos con anticuerpos específicos anti-eIF4E. La figura 14 muestra que el eIF4E se distribuye por todo el citoplasma tanto en las células sin infectar como infectadas por SINV. Cuando las células sin infectar se tratan con 0.5  $\mu$ M hipp, parte del eIF4E se relocaliza en SGs. Al igual que se observa con el eIF4A (Figura 4), a las 5 hpi también se distinguen dos patrones de distribución para el eIF4E en las células infectadas y tratadas con hipp. En uno de estos patrones, se ensamblan SGs y la distribución de la proteína C es difusa, mientras que en las células que no contienen SGs, la proteína viral C se localiza cerca del núcleo. En las células infectadas con SINV, tanto tratadas con hipp como sin tratar, no existe colocalización del eIF4E con C a las 5 u 8 hpi: el coeficiente de correlación de Pearson para estas dos proteínas es de 0.31. Estos resultados apuntan a que el eIF4E no se usa para traducir el sgRNA, en concordancia con datos previos que sugieren que el sgRNA de SFV manifiesta un bajo requerimiento del eIF4E [114]. Además, la rapamicina, un inhibidor que interfiere con la actividad del eIF4E, tiene poco efecto sobre la replicación de SINV [149].

Con el objetivo de analizar con más detalle el mecanismo de traducción del sgRNA independiente del eIF4F, empleamos una molécula denominada 4EGI-1, descrita como un inhibidor selectivo de la traducción dependiente de cap, que más concretamente bloquea la interacción entre el eIF4G y el eIF4E [150]. Mediante marcaje radiactivo de la síntesis de proteínas estudiamos el efecto de este compuesto en células BHK infectadas con SINV y otros virus animales (VSV y EMCV) que, en principio, no utilizan el eIF4E [95,142,143,151]. La figura 15A muestra que el tratamiento con 30  $\mu$ M 4EGI-1 disminuye la síntesis de proteínas en torno al 40% en las células BHK control, y en más del 70% al usar 60  $\mu$ M. Se observa una inhibición similar de la traducción en el caso de SINV y VSV (Figuras 15B y 15C, respectivamente), mientras que la síntesis de proteínas de EMCV es más resistente (Figura 15D) pero aun así se inhibe en un 50% al tratar con 50-60  $\mu$ M 4EGI-1. Con estos resultados se podría pensar que la inhibición de la traducción de los mRNAs virales por 4EGI-1 debe ser causada principalmente por un motivo distinto del bloqueo de la interacción entre el eIF4E y el eIF4G. Por esta razón examinamos con más detalle el efecto de 4EGI-1 en células BHK. Tratamos, en primer lugar, células BHK con diferentes concentraciones de 4EGI-1 y analizamos después mediante marcaje radiactivo la inhibición de la síntesis de proteínas, y mediante *Western blot* la cantidad y estabilidad de los tres componentes del complejo eIF4F, que no se ven alterados (Figura 16A).



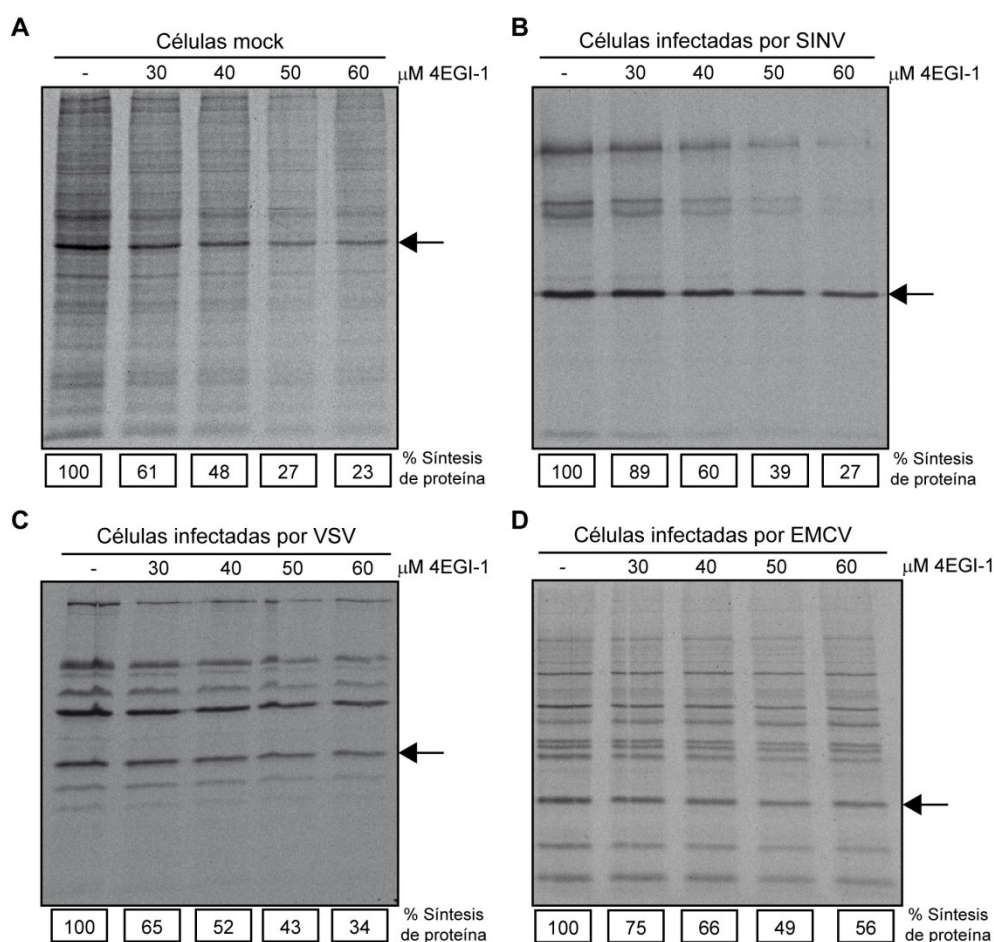


**Figura 14. Localización subcelular del eIF4E, la proteína C de SINV y TIA-1 en células BHK control e infectadas con SINV, en presencia o ausencia de hipp.** Se infectaron células BHK, previamente sembradas en cubreobjetos de cristal, con SINV a 5 ufp/célula, o se dejaron sin infectar (mock). A las 3.5 ó 6.5 hpi, las células se trataron durante 90 minutos con 0 ó 0.5 μM hipp. A las 5 u 8 hpi las células fueron fijadas, permeabilizadas y procesadas para inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-eIF4E (verde), anti-proteína C de SINV (cian) o anti-TIA-1 (rojo). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal y se procesaron seguidamente con el software Huygens 4.1.

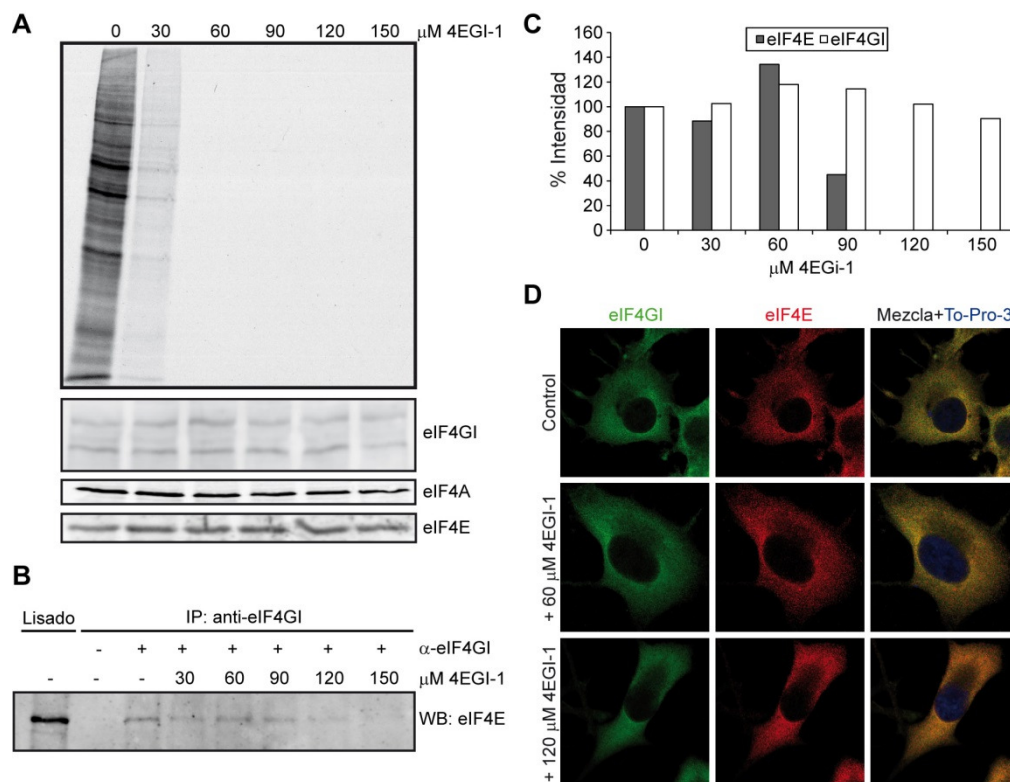
Para examinar si el eIF4E co-inmunoprecipita con el eIF4G en presencia de diferentes concentraciones del compuesto, hicimos un ensayo de inmunoprecipitación usando anticuerpos policlonales de conejo anti-



eIF4G. Como se esperaba, en el control sin anticuerpos anti-eIF4G no se observa co-inmunoprecipitación del eIF4E (Figura 16B). Además, la co-inmunoprecipitación del eIF4E se inhibe parcialmente en presencia de 90  $\mu\text{M}$  4EGI-1, mientras que el tratamiento con 120  $\mu\text{M}$  del compuesto ya bloquea absolutamente la interacción eIF4G-eIF4E (Figuras 16B y 16C). En este ensayo, concentraciones menores de 90  $\mu\text{M}$  no tienen efectos sobre la interacción del eIF4E con el eIF4G, a pesar de que la traducción celular se bloquea totalmente en presencia de 60  $\mu\text{M}$  4EGI-1 (Figura 16A). Finalmente, estudiamos la distribución celular del eIF4G y del eIF4E en células tratadas con dos concentraciones diferentes del inhibidor. Como se observa en la figura 16D, hay colocalización de estos dos factores incluso a concentraciones altas de 4EGI-1, lo que indica que no se modifican sus distribuciones intracelulares al prevenir la interacción entre el eIF4E y el eIF4G. Estos resultados sugieren que la síntesis de proteínas celulares se inhibe en presencia del compuesto 4EGI-1 incluso a concentraciones inferiores a aquellas que bloquean la interacción entre el eIF4E y el eIF4G, en concordancia con otros trabajos previos [152], por lo que este inhibidor debe afectar a alguna otra etapa de la traducción todavía sin determinar. Por tanto, este compuesto no es una buena herramienta para analizar la participación del eIF4E en la traducción del sgRNA de SINV ni de otros mRNAs virales o celulares.



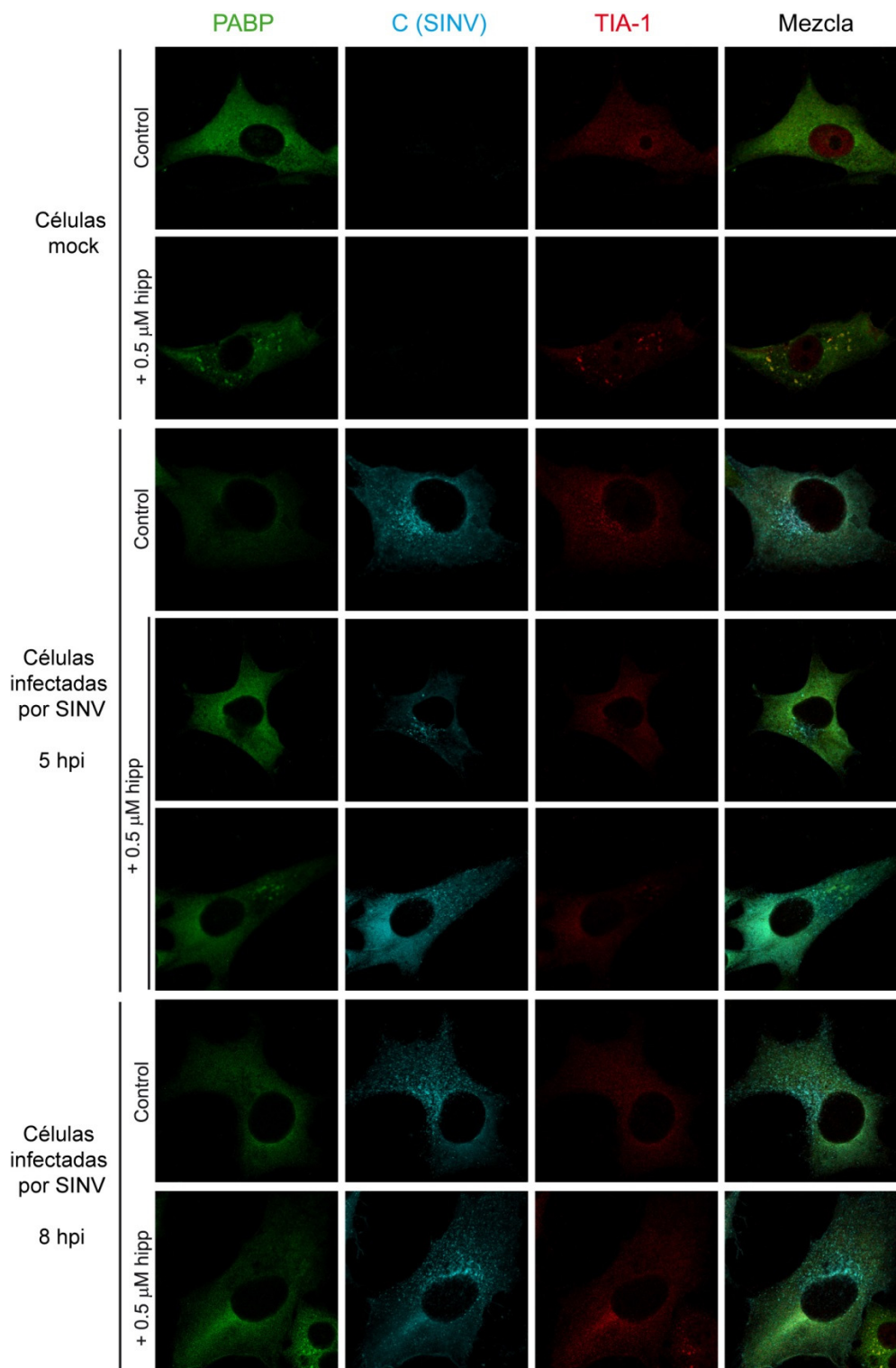
**Figura 15. Actividad de 4EGI-1 en células BHK infectadas por SINV.** A-D) Se infectaron células BHK con SINV (B), VSV (C) o EMCV (D) a una multiplicidad de infección de 10 ufp/célula, o se dejaron sin infectar (A). A las 6 hpi (o a las 4 hpi en el caso de EMCV), las células se trataron con diferentes concentraciones de 4EGI-1 durante 30 minutos y después se marcaron con [ $^{35}\text{S}$ ]Met-Cis durante 60 minutos en presencia del compuesto a las mismas concentraciones que antes. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y autorradiografía. Debajo de cada carril se indica el porcentaje de síntesis de proteínas en células tratadas con 4EGI-1 en comparación con las células sin tratar, calculado a partir de los valores obtenidos mediante densitometría de las bandas indicadas con una flecha.



**Figura 16. Efecto de 4EGI-1 en la estabilidad de los componentes del eIF4F y en la interacción eIF4G-eIF4E en células BHK.**

A) Se trataron células BHK con 4EGI-1 a las concentraciones indicadas durante 30 minutos y se marcaron con [ $^{35}\text{S}$ ]Met-Cis durante 60 minutos en presencia del compuesto a las mismas concentraciones. Las muestras se recogieron en buffer *sample* y se analizaron mediante SDS-PAGE y autorradiografía (panel superior). En paralelo, se detectaron las proteínas eIF4G, eIF4A y eIF4E mediante *Western blot* usando anticuerpos específicos. B, C) Se trataron células BHK con 4EGI-1 a diferentes concentraciones durante 90 minutos. A continuación, los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-eIF4G. La asociación específica del eIF4E con el eIF4G se analizó mediante *Western blot* usando anticuerpos anti-eIF4E (B). En la gráfica de barras (C) se representa la cuantificación de las proteínas inmunoprecipitadas en los *Western blots* del eIF4E (B) y del eIF4G (no mostrado). D) Se sembraron células BHKs en cubreobjetos de cristal y se trataron durante 90 minutos con 0, 60 ó 120  $\mu\text{M}$  4EGI-1. Después, las células fueron fijadas, permeabilizadas y procesadas para inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-eIF4G (verde) y anti-eIF4E (rojo). Los núcleos se tiñeron con To-Pro-3 (azul). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal y se procesaron con el software Huygens 4.3.

Hasta el momento no se conoce prácticamente nada acerca de la función de PABP en células infectadas por alfavirus. Puesto que los mRNAs de SINV contienen una cola de poli(A), es razonable suponer que PABP pueda participar en su traducción. Para evaluar esta posibilidad, analizamos la inmunolocalización de PABP en células infectadas por SINV, siguiendo un protocolo análogo al descrito anteriormente para el eIF4A y el eIF4E. Como se muestra en la figura 17, el patrón de distribución de PABP es similar al observado para los otros dos factores. Así, a las 5 y 8 hpi se puede apreciar una cantidad menor de PABP en aquellas regiones donde la traducción viral se está llevando a cabo. Además, el coeficiente de correlación de Pearson para PABP y la proteína C es de 0.38, lo que sugiere que PABP no participa en la traducción del sgRNA de SINV.

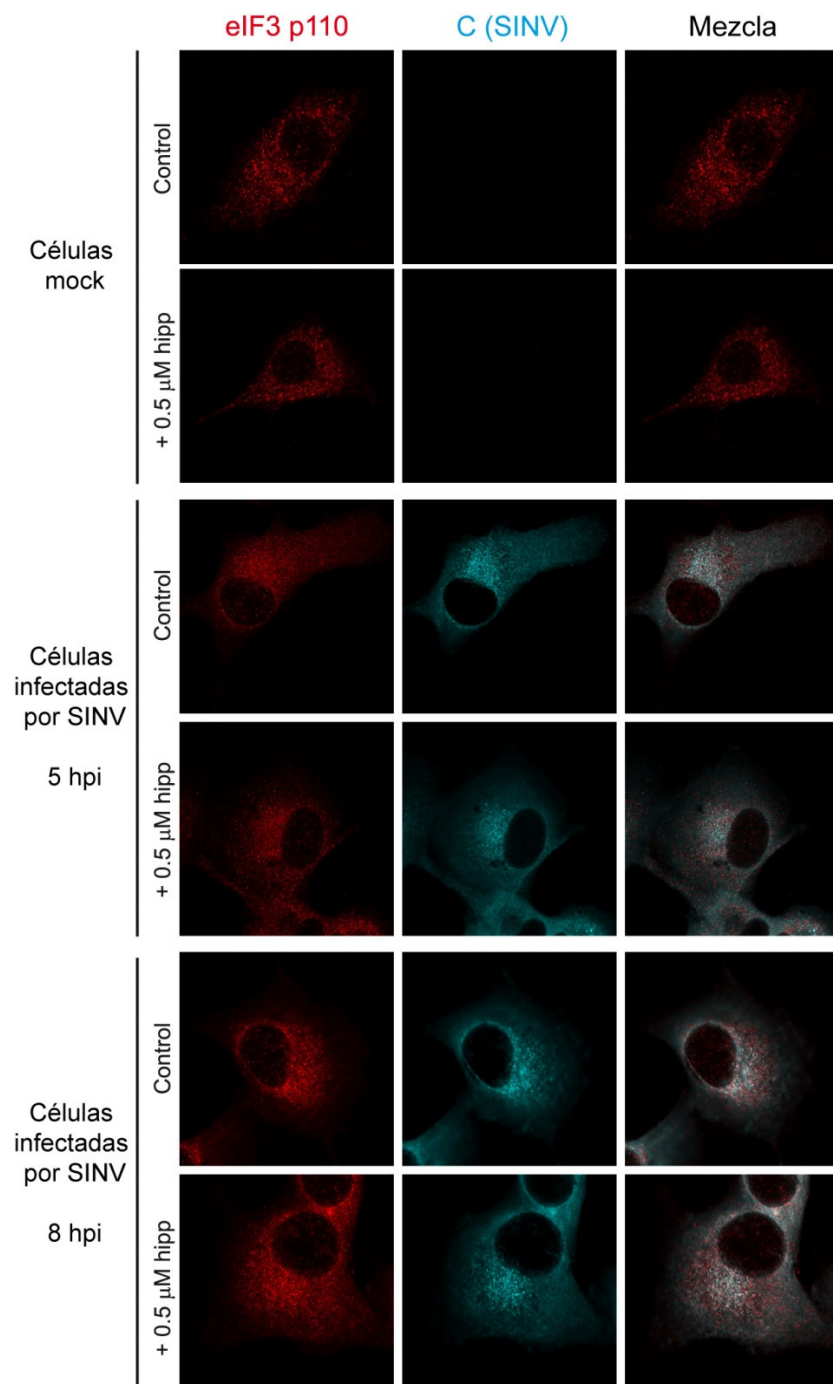


**Figura 17. Localización subcelular de PABP, la proteína C de SINV y TIA-1 en células BHK control e infectadas por SINV, con y sin tratamiento con hipp.** Se sembraron células BHK en cubreobjetos de cristal y se infectaron con SINV (5 ufp/célula) o se dejaron sin infectar (células mock). A las 3.5 ó 6.5 hpi, las células se trataron durante 90 minutos con 0.5  $\mu$ M hipp, o se dejaron sin tratar. A las 5 u 8 hpi, respectivamente, las células fueron fijadas, permeabilizadas y procesadas para inmunofluorescencia con anticuerpos anti-PABP (verde), anti-proteína C de SINV (cian) o anti-TIA-1 (rojo). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal y procesadas después con el software Huygens 4.1.

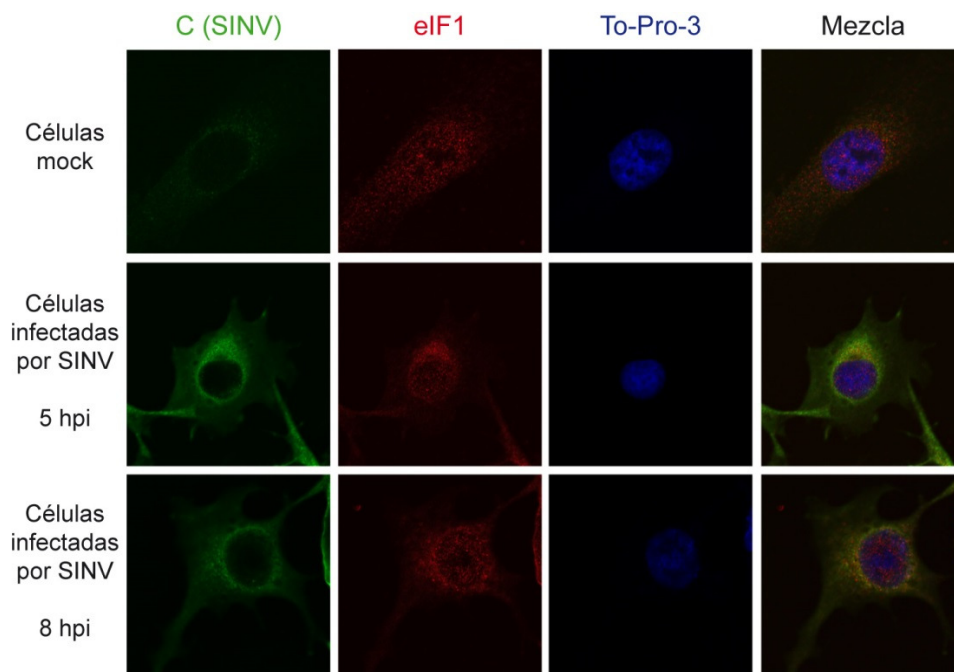
Actualmente, existen resultados contradictorios con respecto a la participación del eIF3 en la traducción del sgmRNA de alfavirus. Al parecer, este factor es necesario para traducir la gran mayoría de mRNAs virales y celulares, con la excepción del IRES de la IGR de dicistrovirus [86,153,154]. Los resultados obtenidos en sistemas reconstituidos *in vitro* con componentes purificados de la maquinaria de traducción indican que únicamente el eIF3, DHX29 y el eIF2D son necesarios para iniciar la síntesis de proteínas dirigida por el sgmRNA de SINV [13]. Por el contrario, en células infectadas con SFV, el eIF3 se localiza en SGs [99], lo que sugiere que este factor podría no estar interviniendo en la síntesis de proteínas virales tardías. Puesto que el sgmRNA de SINV exhibe diferentes requerimientos de eIFs *in vitro* en comparación con células infectadas, decidimos analizar la participación del eIF3 en la traducción del sgmRNA de SINV en infecciones mediante un análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpos contra la subunidad p110 (también llamada eIF3C) de este factor. Con este fin infectamos células BHK con SINV o las dejamos sin infectar, y las tratamos con 0.5  $\mu$ M hipp durante 90 minutos antes de proceder a la fijación. A las 5 y 8 hpi procesamos las células para inmunofluorescencia usando un anticuerpo de conejo dirigido contra la subunidad p110 del eIF3 (Figura 18). Esta subunidad del eIF3 colocaliza con la proteína C de SINV (el coeficiente de correlación de Pearson es de 0.71), lo que apunta a que este factor sí podría estar involucrado en la traducción del sgmRNA viral en células infectadas.

Por último, se ha descrito que el eIF1 no interviene en la traducción del sgmRNA de SINV en sistemas reconstituidos *in vitro*, en ausencia del eIF2 [13]. En cambio, no se ha estudiado su posible implicación en la traducción de los mRNAs de alfavirus en células infectadas. Con este objetivo, infectamos células BHK con SINV y analizamos la localización de eIF1 a las 5 y 8 hpi. Como se muestra en la figura 19, eIF1 colocaliza con la proteína C de SINV en las regiones perinucleares donde tiene lugar la traducción viral. Por tanto, este factor podría estar participando en la traducción del sgmRNA de SINV en un contexto de infección, a diferencia de lo que se ha observado *in vitro*.

En resumen, la síntesis de proteínas dirigida por el sgmRNA de SINV podría no requerir el eIF2, eIF4A, eIF4E, PABP y eIF4G, mientras que hay indicios de que el eIF3 y el eIF1 sí podrían ser necesarios para la traducción de este mRNA viral. Si esto fuera así, estaríamos ante un mecanismo de traducción novedoso en el que un mRNA capeado, con una 5'-UTR corta y sin estructura secundaria, no requiere de la mayoría de eIFs para traducirse, salvo el eIF3 y el eIF1, en células infectadas.



**Figura 18. Localización subcelular de la subunidad p110 del eIF3 y de la proteína C de SINV en células BHK control e infectadas por SINV.** Se infectaron células BHK con SINV (5 ufp/célula) o se dejaron sin infectar (mock). A las 3.5 ó 6.5 hpi las células fueron dejadas sin tratar o tratadas durante 90 minutos con 0.5  $\mu$ M hipp. A las 5 u 8 hpi las células se fijaron, permeabilizaron y procesaron para inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-eIF3 p110 (rojo) y anti-proteína C de SINV (cian). Se adquirieron las imágenes en un microscopio confocal, y posteriormente fueron procesadas con el software Huygens 4.1. La mezcla de las imágenes representa la visualización simultánea del eIF3 p110 y C de SINV.



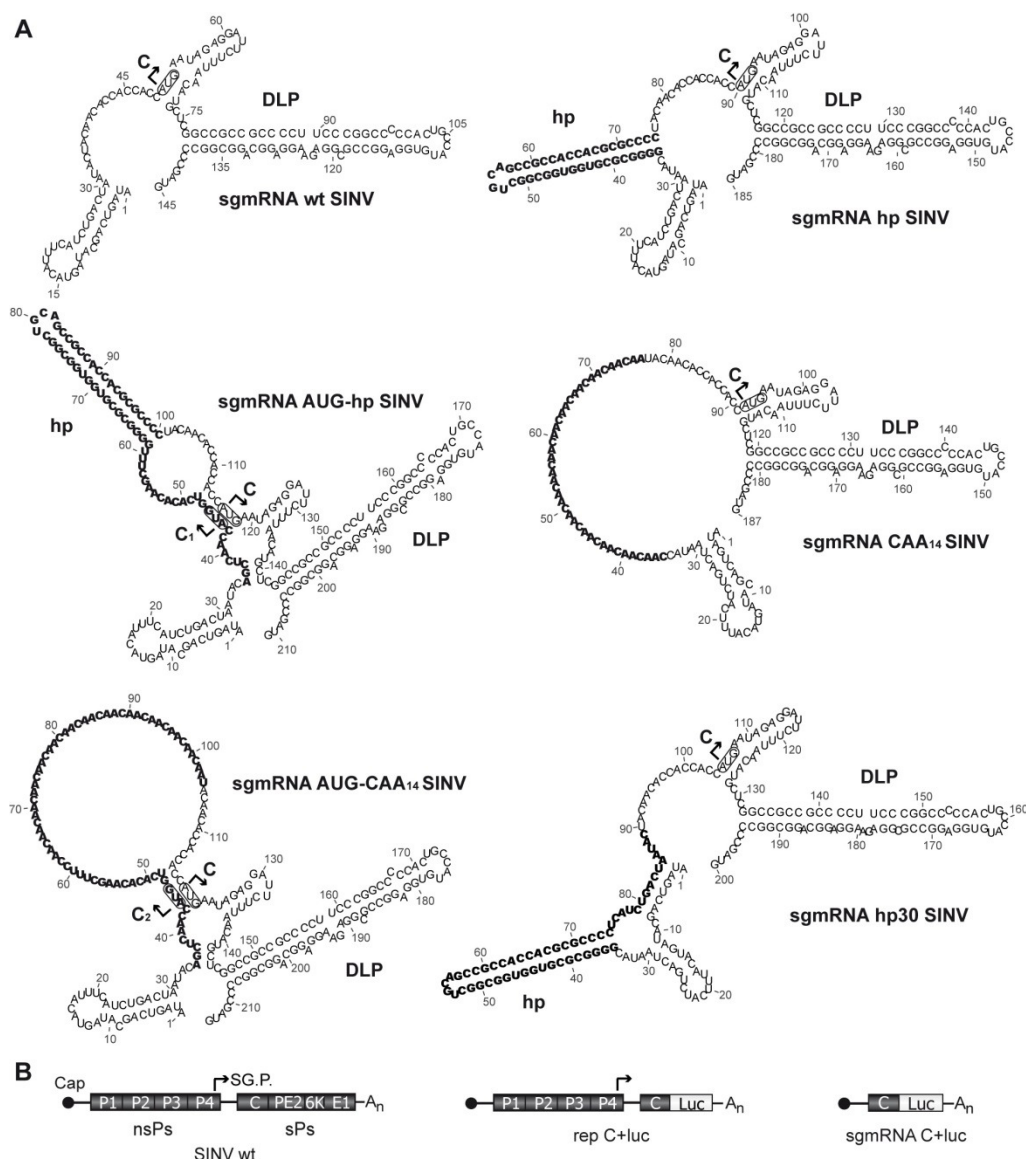
**Figura 19. Localización subcelular del eIF1 y de la proteína C de SINV en células BHK control e infectadas por SINV.** Se sembraron células BHK en cubreobjetos de cristal y se infectaron con SINV a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula, o se dejaron sin infectar (mock). A las 5 u 8 hpi las células fueron fijadas, permeabilizadas y procesadas para inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-proteína C de SINV (verde) y anti-eIF1 (rojo), y To-Pro-3 para teñir el núcleo (azul). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal.



## 4.2. ESTUDIO DEL MECANISMO DE SELECCIÓN DEL CODÓN DE INICIACIÓN EN EL sgmRNA DE SIN V

### 4.2.1. Mecanismo de iniciación de la síntesis de proteínas dirigida por el sgmRNA de SIN V

Se pueden concebir dos mecanismos diferentes para la iniciación de la traducción del sgmRNA de SIN V: uno es la interacción del complejo de preiniciación con la estructura cap seguido del *scanning* de la 5'-UTR hasta que se encuentra el AUGi. Otra opción es que la iniciación tenga lugar a través de la interacción directa del complejo de preiniciación con el codón AUG, sin *scanning* previo. Existen evidencias de que este segundo mecanismo ocurre en sistemas libres de células reconstituidos con componentes purificados de la maquinaria de traducción [13]. Por eso, nuestro siguiente objetivo fue determinar cuál de estos dos mecanismos opera en células infectadas. Para ello se diseñaron varias construcciones basadas en el replicón rep C+luc, que están representadas en las figuras 20A y 20B (ver también la descripción en la tabla S3). Obtuvimos los diferentes replicones mediante transcripción *in vitro* y los transfectamos en células BHK para estimar posteriormente la eficacia traduccional de sus sgmRNAs midiendo la actividad luc. Como control usamos rep C+luc (Figura 20B), que tiene la L26S genuina. El replicón rep C+luc hp contiene en su sgmRNA una estructura en forma de horquilla en medio de la 5'-UTR, situada antes del codón de iniciación, exactamente a 34 nucleótidos del extremo 5'. Esta horquilla *hp* tiene una energía libre mínima de -45.30 kcal/mol (según la predicción de *RNAfold*, Univ. Viena) y, en principio, no debería poder ser desnaturalizada por los complejos de preiniciación [62,155,156]. Por tanto, debería detener el proceso de *scanning* de la región 5'-UTR en caso de que éste fuera el mecanismo de iniciación del sgmRNA. Como control también analizamos un sgmRNA derivado de rep C+luc CAA<sub>14</sub>, que contiene una 5'-UTR más larga pero sin estructura secundaria en la que se insertaron 14 codones CAA en la posición 34, al igual que todas las demás modificaciones de la L26S. Por tanto, ninguna de estas modificaciones afecta a la región codificante de la nsP4 ni a los codones de parada, que solapan con el inicio de secuencia del sgmRNA. En el modelo de *scanning* la inserción de un AUG previo en buen contexto de secuencia [157] debería reducir la iniciación desde un AUG posterior. Por eso diseñamos dos construcciones más que incluyen un codón AUG localizado antes de la horquilla *hp* y antes del inserto CAA<sub>14</sub>: rep C+luc AUG-hp y rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub>, respectivamente (Figura 20A).



**Figura 20. Modelos de estructura secundaria de diferentes sgRNAs mutantes de SINV con modificaciones en la L26S antes del codón de iniciación.** A) Se representan las estructuras secundarias del extremo 5' de las construcciones basadas en el sgRNA de SINV, obtenidas mediante el programa de predicción *RNAfold*. Los insertos introducidos en la L26S se resaltan en negrita. Los codones de iniciación AUG se muestran en recuadros; además, las flechas indican el sitio de inicio de la síntesis de proteína C a partir del AUG genuino, y de las variantes C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> a partir de los AUGs añadidos en fase (en los mutantes AUG-hp y AUG-CAA<sub>14</sub>, respectivamente). B) Representación esquemática del genoma de SINV, del replicón rep C+luc y del mRNA subgenómico C+luc. nsPs, proteínas no estructurales; sPs, proteínas estructurales; SG.P., promotor subgenómico (simbolizado por una flecha).

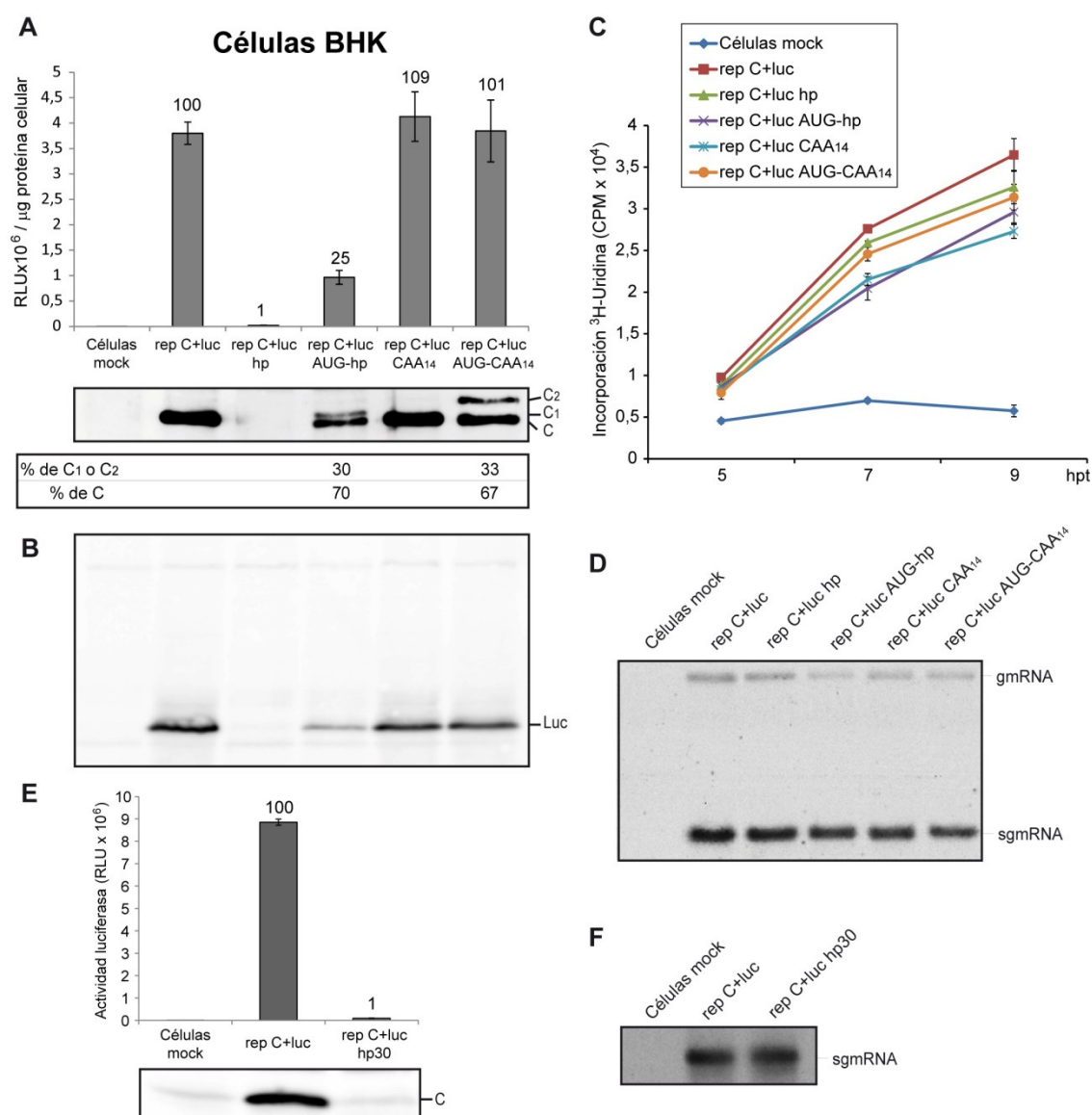
La transfección de células BHK con el replicón rep C+luc resulta en una producción muy robusta de luc que podemos detectar midiendo su actividad (Figura 21A, panel superior). Por el contrario, la síntesis de luc es mínima en las células transfectadas con rep C+luc hp, lo que sugiere que es necesario escanear la 5'-UTR del sgRNA para iniciar la traducción. En el caso de rep C+luc CAA<sub>14</sub> no hay caída de la síntesis de luc respecto a rep C+luc (Figura 21A, panel superior). La transfección de células BHK con rep C+luc AUG-hp estimula la producción de luc en unas 38 veces con respecto a rep C+luc hp, lo que indica que tras la formación del complejo de iniciación, los ribosomas 80S pueden pasar a través de la horquilla. Sin embargo, la síntesis de luc con esta construcción tan solo alcanza un ~25% de la obtenida con rep C+luc. Este



resultado concuerda con algunos datos previos que demuestran que la inserción de un AUG antes de una horquilla no rescata totalmente la traducción del mRNA correspondiente [158]. Por otra parte, la eficacia de traducción del sgmRNA de rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> es similar a la de los sgmRNAs de rep C+luc y rep C+luc CAA<sub>14</sub>. Estos hechos son consistentes con la idea de que la detección del AUGi durante la traducción del sgmRNA de SINV debe ocurrir mediante un proceso de *scanning* y no por un posicionamiento directo del ribosoma sobre el codón de iniciación.

La traducción del sgmRNA de los diferentes replicones descritos implica la producción una poliproteína, que codifica para la proteína C y luc. Estas dos proteínas se liberan debido a la actividad autocatalítica de C, que corta la poliproteína en el extremo carboxilo inmediatamente después de su generación [3]. Para medir la producción de proteína C y comprobar desde qué AUG se ha iniciado la traducción en las células transfectadas con estos replicones, se realizaron inmunoblots con anticuerpos policlonales de conejo específicos. Como se esperaba, se detecta una fuerte producción de C en las células transfectadas con rep C+luc, mientras que no se observa prácticamente nada tras la transfección con rep C+luc hp (Figura 21A, panel central). Cuando las células son transfectadas con rep C+luc AUG-hp y rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> se detectan dos especies inmunorreactivas de la proteína C con diferentes tamaños. Las diferentes secuencias codificantes incluidas entre los nuevos AUGs insertados y el AUG genuino del sgmRNA podrían ser la causa de la diferente movilidad observada en los productos reconocidos por el anticuerpo: C, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>. En ambas construcciones, aproximadamente el 70% de la proteína C total tiene la misma movilidad que C wt, consistente con una iniciación a partir del segundo codón AUG que se corresponde con el codón de iniciación genuino del sgmRNA de SINV. El 30% restante de C se genera a partir del primer AUG añadido en fase y dentro de un buen contexto para la traducción (Figura 21A, panel inferior). Además, la síntesis de C genuina a partir de rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> es un 45% menor que en rep C+luc CAA<sub>14</sub>. Este resultado apoya también el modelo de *scanning*. Para analizar si los aminoácidos extra en el amino-terminal de la proteína C influyen en el corte del precursor C+luc, realizamos un *Western blot* usando anticuerpos policlonales de conejo frente a luc. La figura 21B muestra la producción de una única banda correspondiente a luc, mientras que el precursor C+luc no es detectado, lo que indica que las nuevas proteínas elongadas son tan eficientes como la genuina realizando el corte autoproteolítico.

Una posible explicación para las diferencias observadas en la síntesis de proteínas con los diferentes replicones analizados es que la horquilla, o las secuencias, introducidas afecten al promotor interno que dirige la transcripción de los sgmRNAs correspondientes. En tal caso, la síntesis de los RNAs virales y la cantidad de sgmRNA transcrito se verían alteradas en las células transfectadas con estas construcciones. Para asegurarnos de que esto no está ocurriendo, decidimos detectar las cantidades de RNA viral producidas. Con este fin transfectamos células BHK con los diferentes replicones, marcamos radiactivamente con [<sup>3</sup>H]-uridina los RNAs sintetizados en presencia de actinomicina D, y medimos la radiactividad en un contador de centelleo. La actinomicina D paraliza la síntesis de RNA celular mientras que la replicación del genoma viral, la transcripción del sgmRNA y la traducción no se ven afectados.



**Figura 21. Traducción y síntesis de RNAs específicos de SINV en células BHK transfectadas con diferentes replicones.** A, B, E) Se transfectaron células BHK con Lipofectamina 2000 y los replicones de SINV representados en la figura 20, previamente transcritos *in vitro*. A las 7 hpt, las células se recogieron en buffer de lisis y se midió la actividad luc. Los resultados se muestran en las gráficas (A y E, paneles superiores) en RLU por μg de proteína celular, y corresponden a las medias ± D.E. de tres experimentos representativos. En las gráficas se indican los valores porcentuales obtenidos al comparar los replicones mutantes con rep C+luc. En paralelo, se detectó la proteína C de SINV y luc mediante *Western blot* usando anticuerpos específicos anti-proteína C (A, panel central y E, panel inferior) y anti-luc (panel B), respectivamente. Los porcentajes relativos de proteína C genuina y proteínas mutantes C<sub>1</sub> o C<sub>2</sub> se calcularon a partir de los valores obtenidos mediante densitometría (A, panel inferior). C) Se transfectaron células BHK como en (A), se trataron con 5 μg/ml de actinomicina D a partir de las 2 hpt y se marcaron con 40 μCi/ml [<sup>3</sup>H]-uridina a las 4 hpt. Las células se fijaron a los tiempos indicados tal y como se describe en *Materiales y Métodos*, y se recogieron para medir la incorporación de [<sup>3</sup>H]-uridina en un espectrómetro de centelleo líquido. Las cuentas por minuto (CPM) son la media ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. D, F) Se transfectaron células BHK como en (A). A partir de las 2 hpt, se trataron las células con 5 μg/ml de actinomicina D y a partir de las 3 hpt con 40 μCi/ml [<sup>3</sup>H]-uridina. A las 7 hpt se extrajo el RNA total, se separó en geles de agarosa al 0.7% y se sometió a fluorografía y autorradiografía.

La incorporación de [<sup>3</sup>H]-uridina y, como consecuencia, la síntesis total de RNA viral es claramente similar en todos los casos (Figura 21C), lo que sugiere que no hay inhibición de la transcripción del sgmRNA de ninguno de los replicones. Para realizar un análisis más profundo, los RNAs virales marcados radiactivamente se visualizaron mediante separación por electroforesis en geles de agarosa y autorradiografía. En concordancia con los resultados mostrados en la figura 21C, la cantidad de sgmRNA es

similar en las células transfectadas con rep C+luc o con rep C+luc hp (Figure 21D), lo que respalda la conclusión de que la escasa síntesis de proteínas obtenida con rep C+luc hp no se debe a un bloqueo de la transcripción viral. La proporción de sgmRNA sintetizado frente a gmRNA es aproximadamente 10:1 en todas las células transfectadas con los diferentes replicones.

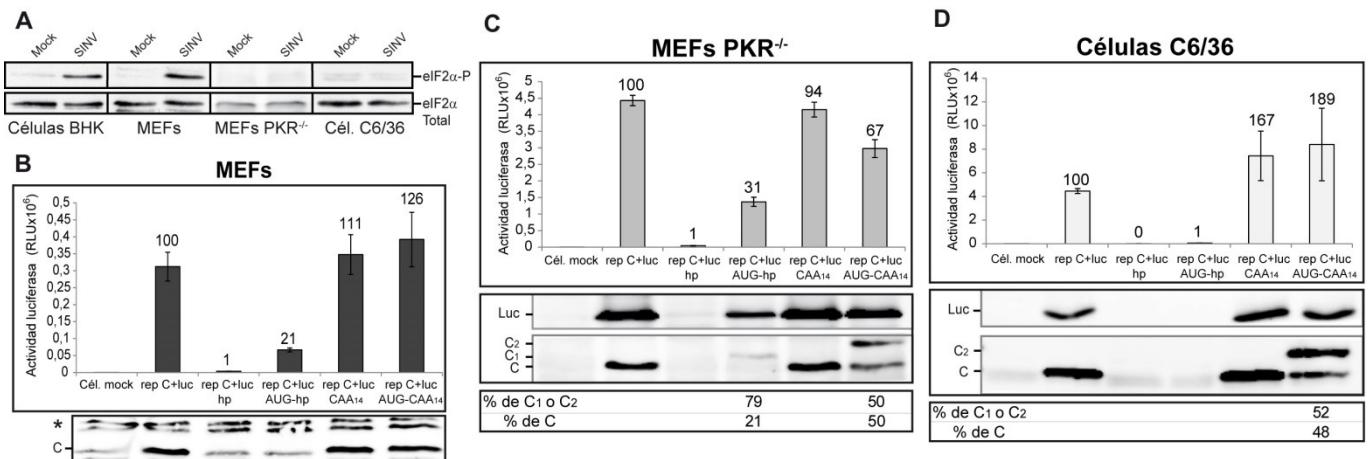
No obstante, se puede argumentar que la horquilla insertada en la L26S podría estar impidiendo una hipotética interacción directa de los ribosomas 80S con el AUGi. Para descartar esta posibilidad, diseñamos una construcción adicional, rep C+luc hp30, y la analizamos en células BHK siguiendo un protocolo análogo a los anteriores. En esta construcción, la estructura *hp* está separada del codón de iniciación genuino por 30 nucleótidos (ver figura 20A). Además, hay que tener en consideración que los nucleótidos iniciales del sgmRNA no deben ser modificados ya que son compartidos con la secuencia del promotor interno para la transcripción del sgmRNA. En las células transfectadas con rep C+luc hp30 apenas podemos detectar actividad luc o producción de C (Figura 21E, panel superior e inferior, respectivamente), mientras que la síntesis de sgmRNA no se ve disminuida (Figura 21F). Esto sugiere que la horquilla *hp* introducida en la L26S impide el *scanning* en este sgmRNA, y se podría descartar de nuevo un posicionamiento directo del ribosoma sobre el AUGi.

En resumen, todas estas observaciones obtenidas con las diferentes construcciones en células BHK apoyan la existencia de un mecanismo de *scanning* para la traducción del sgmRNA.

#### **4.2.2. Scanning y selección del AUG en diferentes células donde replica SINV: MEFs, MEFs PKR<sup>-/-</sup> y C6/36**

La replicación de alfavirus induce una fuerte fosforilación del eIF2 $\alpha$ , principalmente a través de la activación de PKR mediada por la presencia de RNAs virales de doble cadena [12,21,99,100]. La inactivación de este factor podría estar determinando el mecanismo de iniciación de la traducción del sgmRNA. Por este motivo, a continuación analizamos su traducción en células en las que replica SINV pero que no experimentan fosforilación del eIF2 $\alpha$ . Con este fin, expresamos los mismos replicones del apartado anterior en MEFs PKR<sup>-/-</sup> y en células de insecto para estimar posteriormente actividad luc y producción de C. Como control inicial, detectamos la fosforilación del eIF2 $\alpha$  en las diferentes líneas celulares infectadas con SINV (Figura 22A). El eIF2 $\alpha$  se fosforila en células BHK y en MEFs, mientras que en MEFs PKR<sup>-/-</sup> y en células de insecto no se detecta la aparición del eIF2 $\alpha$  fosforilado. También examinamos la síntesis de luc y la producción de C en MEFs transfectadas con los diferentes replicones, con la intención de usarlas como control de las MEFs PKR<sup>-/-</sup>. La producción de luc tras la transfección de MEFs con rep C+luc, rep C+luc CAA<sub>14</sub> o rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> es muy baja, y supone un 10% de la cantidad obtenida en MEFs PKR<sup>-/-</sup> (Figura 22B, panel superior). Además, la acumulación de C apenas se detecta mediante *Western blot* y únicamente se reconoce al emplear un reactivo de alta intensidad (Figura 22B, panel inferior). Esto

concuera con que la línea wt de MEFs es poco susceptible de infectarse por SINV [100] y la transfección con replicones del virus da lugar a una menor expresión de la proteína C o luc [24]. De nuevo, el replicón rep C+luc hp no origina prácticamente nada de luc o C. La producción se recupera parcialmente en el caso de rep C+luc AUG-hp, pero sigue habiendo una inhibición del 79% con respecto a rep C+luc. En MEFs  $PKR^{-/-}$  transfectadas con rep C+luc hp, la síntesis de luc está inhibida totalmente, hasta un 99% menos que rep C+luc (Figura 22C, panel superior). En cambio, la transfección con rep C+luc AUG-hp aumenta la producción de luc en 34 veces al compararla con el replicón rep C+luc hp. Pero al igual que se observa en células BHK (Figura 21A), hay todavía un 70% de inhibición con respecto a rep C+luc. La traducción del sgRNA de rep C+luc CAA<sub>14</sub> es similar al control rep C+luc, lo que sugiere que el incremento de la longitud de la L26S tiene poco efecto sobre la traducibilidad del mismo. La inserción de un codón AUG extra en un buen contexto de iniciación en rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> reduce la síntesis de luc, pero sólo un 30%. Por tanto, la traducción del sgRNA de SINV debe iniciarse mediante un mecanismo de *scanning* también en MEFs  $PKR^{-/-}$ . Resulta interesante comprobar, al analizar la síntesis de C mediante *Western blot*, que se produce iniciación de la traducción desde el primer AUG en el 80% de los casos con rep C+luc AUG-hp, mientras que con rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> hay aproximadamente un 50% de iniciación en cada uno de los codones AUG (Figura 22C, panel central e inferior). Este resultado concuerda con el concepto de que la presencia de una horquilla situada a una distancia de 14 nucleótidos después del primer AUG induce la iniciación en este codón [155]. La producción de C desde el AUG genuino en rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> se reduce en un 52% con respecto a rep C+luc CAA<sub>14</sub> (Figura 22C, panel central), lo que también respalda un mecanismo de *scanning*. Aparte de medir la actividad luc, analizamos también la producción de luc mediante inmunoblot (Figura 22C, panel central); los resultados obtenidos concuerdan con los de C.



**Figura 22. Síntesis de proteínas en MEFs, MEFs  $PKR^{-/-}$  y células C6/36 transfectadas con replicones de SINV con L26S mutada.** A) Células BHK, MEFs, MEFs  $PKR^{-/-}$  y C6/36 fueron infectadas con SINV a 5 ufp/célula, o dejadas sin infectar. A las 7 (células BHK y MEFs), 5 (MEFs  $PKR^{-/-}$ ) u 8 (células C6/36) hpi, se recogieron las células en buffer *sample* y se analizaron mediante *Western blot* con anticuerpos anti-eIF2 $\alpha$  fosforilado (eIF2 $\alpha$ -P) y anti-eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$  Total). B-D) MEFs (B), MEFs  $PKR^{-/-}$  (C) y células C6/36 (D) fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 y replicones de SINV transcritos *in vitro*. A las 7, 5 u 8 hpt, respectivamente, se recogieron las células en buffer de lisis y se midió la actividad luc. Los valores de actividad luc son la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos representativos; se indican en las gráficas los porcentajes obtenidos al relacionar los replicones mutantes con rep C+luc (B-D, paneles superiores). La acumulación de C y luc se analizó por *Western blot* con anticuerpos anti-proteína C de SINV y anti-luc, respectivamente (C y D, paneles centrales). Los porcentajes de C genuina y de proteínas mutantes C<sub>1</sub> o C<sub>2</sub> en relación a la suma de todas las señales de C en cada carril se estimaron mediante densitometría (C y D, paneles inferiores). \* señala bandas inespecíficas.

En células de mosquito C6/36 transfectadas con los replicones anteriores se observan ciertas similitudes, pero también algunas diferencias, en comparación con MEFs  $PKR^{-/-}$ . De acuerdo con nuestros resultados en células de mamífero, la síntesis de luc con rep C+luc hp está completamente inhibida (99.8%) en células C6/36 (Figura 22D, panel superior), lo que sugiere que en células de insecto el sgRNA también se traduce siguiendo un mecanismo de *scanning*. Curiosamente, cuando colocamos un AUG extra antes de la horquilla hp (rep C+luc AUG-hp), no se rescata la síntesis de luc, que sigue inhibida en un 98.8% con respecto a rep C+luc (Figura 22D, panel superior). Esto sugiere que el mecanismo de *scanning* podría ser diferente entre células de mamífero y de insecto. Otra posibilidad es que, quizás, existan diferencias en las estructuras del RNA (que podrían depender de varios factores, incluyendo la temperatura del huésped) o en la replicación del virus en los dos tipos celulares. Además, la síntesis de luc en células C6/36 transfectadas con rep C+luc CAA<sub>14</sub> o con rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> es incluso mayor que la derivada de rep C+luc (167-189% de actividad luc con respecto al control). En el sgRNA derivado de rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub>, la iniciación de la traducción se reparte equitativamente entre ambos AUGs (Figura 22D, panel central e inferior). Como sucede en MEFs  $PKR^{-/-}$ , la inserción de un AUG previo en rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> disminuye la aparición de proteína C genuina en un 55% con relación a rep C+luc CAA<sub>14</sub>, lo que apoya todavía más la existencia de un *scanning* en células de insecto. La mayor producción de luc en las células transfectadas con rep C+luc CAA<sub>14</sub> y rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> en comparación con el control rep C+luc también se confirma en el análisis mediante *Western blot* usando anticuerpos frente a luc (Figura 22D, panel central).

En resumen, el sgRNA de SINV se traduce mediante un mecanismo de *scanning* tanto en MEFs  $PKR^{-/-}$  como en células de mosquito. Por otra parte, el sgRNA del replicón rep C+luc AUG-hp usa preferentemente el primer AUG en MEFs  $PKR^{-/-}$  y el segundo en BHKs. Los motivos para esta diferencia podrían estar relacionados con el hecho de que el eIF2 $\alpha$  está fosforilado en células BHK por la replicación de SINV [12] y la iniciación en el segundo codón AUG, que está cerca de la estructura DLP, es resistente a esta fosforilación. En cambio, en MEFs  $PKR^{-/-}$  no se fosforila el eIF2 $\alpha$  y éste puede ser empleado en la iniciación en el primer AUG. Alternativamente, es posible que la maquinaria traduccional de las células BHK no reconozca el primer codón AUG con alta eficiencia por razones desconocidas. Además, este mRNA no es funcional en células de mosquito, tal vez debido a peculiaridades propias de su maquinaria de traducción. Finalmente, el aumento de longitud de la L26S (rep C+luc CAA<sub>14</sub>) no es perjudicial para la traducción del sgRNA en MEFs  $PKR^{-/-}$ , mientras que la síntesis de proteínas dirigida por este sgRNA se incrementa notablemente en células de mosquito.

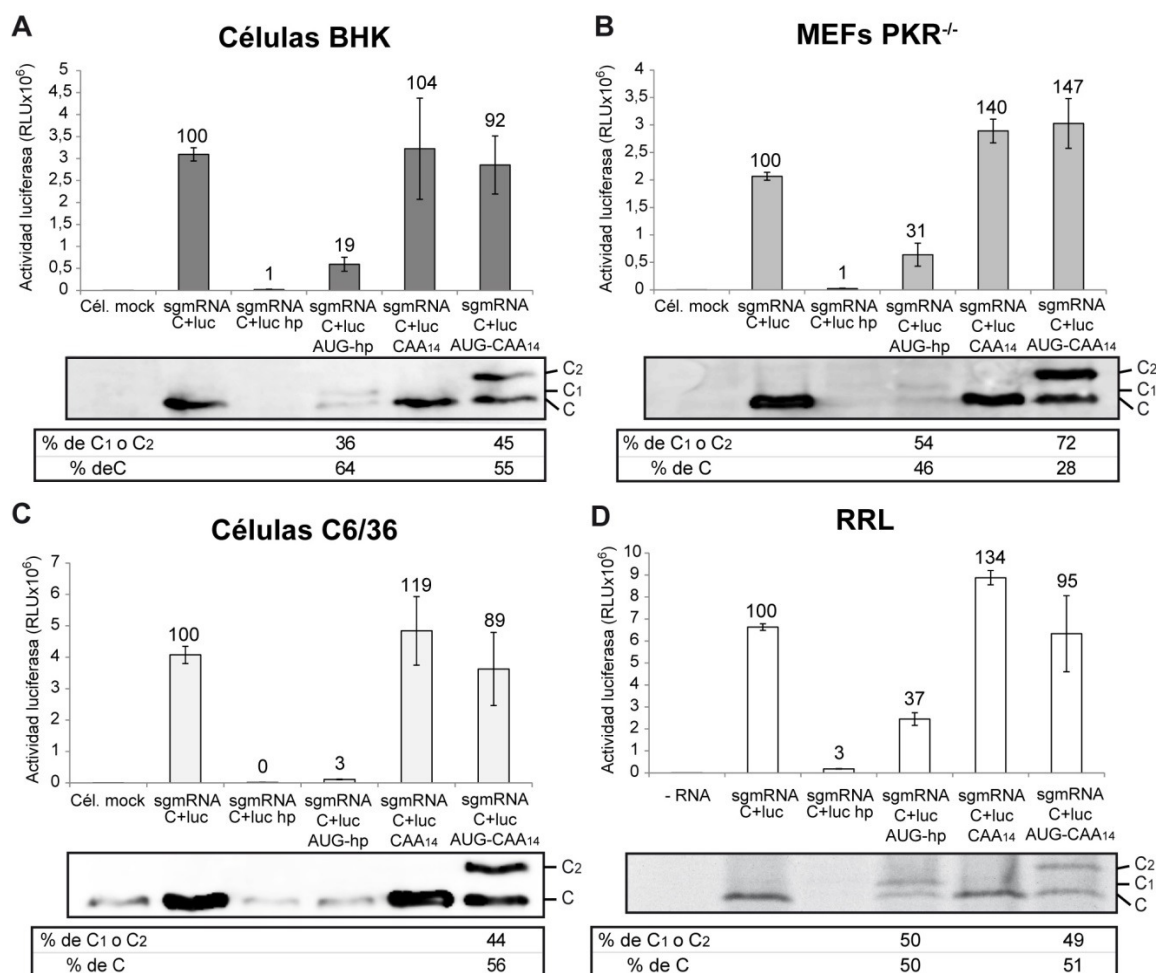
#### 4.2.3. Traducción de variantes del sgRNA de SINV en ausencia de replicación

La síntesis de proteínas dirigida por el sgRNA de SINV está mediada por un mecanismo dual de iniciación, que depende del contexto de su traducción [12,112]. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue

analizar la traducción de los sgmRNAs descritos en ausencia de un contexto de replicación. Con este fin, primero clonamos las secuencias de los distintos sgmRNAs bajo el control del promotor T7 para después obtener, mediante transcripción *in vitro*, los correspondientes sgmRNAs. Posteriormente los transfectamos en distintas líneas celulares para estimar su traducibilidad midiendo actividad luc o mediante *Western blot* con anticuerpos anti-proteína C. Estos sgmRNAs fabricados *in vitro* tienen exactamente la misma secuencia que los producidos en células a partir de los replicones desde el promotor interno. En células BHK transfectadas con sgmRNA C+luc hp, la actividad luc se suprime por completo en comparación con el sgmRNA C+luc control (99% inhibición, Figura 23A, panel superior), al igual que ocurre cuando se transfecta el replicón del que deriva (rep C+luc hp, Figura 21A). Este resultado demuestra que el *scanning* también opera como mecanismo de iniciación de la traducción del sgmRNA fuera del contexto de replicación viral. La presencia de un codón AUG antes de la horquilla (sgmRNA C+luc AUG-hp) provoca una estimulación de la síntesis de luc de 36 veces con respecto al sgmRNA C+luc hp; sin embargo, todavía hay una inhibición del 80% en comparación con el control sgmRNA C+luc. Los demás sgmRNAs testados, sgmRNA C+luc CAA<sub>14</sub> y sgmRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub>, se traducen igual que el control (Figura 23A, panel superior). El análisis de C mediante *Western blot* revela que la iniciación desde los dos AUGs presentes en el sgmRNA C+luc AUG-hp se reparte entre el 36% para el primero y el 64% para el segundo AUG, mientras que esta distribución es del 45% y 55%, respectivamente, para el sgmRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> (Figura 23A, panel central e inferior). Estos resultados son consistentes con los descritos para los replicones en las mismas células.

En células que carecen de la proteína PKR, como MEFs PKR<sup>-/-</sup> o células de mosquito C6/36, la traducción del sgmRNA C+luc hp transfectado también se inhibe considerablemente (Figuras 23B y 23C, paneles superiores). Además, se observan diferencias significativas en la traducción del sgmRNA AUG-hp entre ambas líneas celulares. En MEFs PKR<sup>-/-</sup>, el AUG colocado en fase antes de la horquilla aumenta la traducción en 30 veces comparado con el sgmRNA C+luc hp, aunque sigue inhibida en un 69% con relación al control sgmRNA C+luc (Figura 23B). Por el contrario, el AUG situado antes de la horquilla no aumenta su traducibilidad con respecto al sgmRNA C+luc hp en células de mosquito, mostrando ambos más de un 97% de inhibición en comparación con el control sgmRNA C+luc (Figura 23C). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los replicones de los que proceden. Por otra parte, el sgmRNA C+luc CAA<sub>14</sub> y el sgmRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> funcionan mejor que el mRNA control en MEFs PKR<sup>-/-</sup> (140% y 147%, respectivamente). Estos dos mRNAs también se traducen perfectamente en células C6/36, reafirmando que esta modificación de la L26S no es contraproducente. Igual que sucedía con los replicones (Figura 22C), en MEFs PKR<sup>-/-</sup> transfectadas con el sgmRNA C+luc AUG-hp o con el sgmRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> también se utilizan ambos AUGs, con preferencia por el primero (Figura 23B, panel central e inferior). En células de mosquito, ambos AUGs se reconocen de manera similar en el sgmRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> (Figura 23C, panel central e inferior). Además, al insertar un codón AUG previo se inhibe la producción de C desde el segundo AUG en un 32%, 62% y 53% en células BHK, MEFs PKR<sup>-/-</sup> y C6/36, respectivamente, lo que concuerda con la existencia de un *scanning* de los ribosomas. Como control analizamos las cantidades de

sgmRNA mediante qRT-PCR. Se puede apreciar que, tras la transfección e incubación de las células BHK, la cantidad de todas las variantes del sgmRNA C+luc es muy similar (Figura 24). Como conclusión, el mecanismo de *scanning* es operativo no sólo en células con replicones de SINV, sino también cuando se examina en células la traducción de los mRNAs aislados.

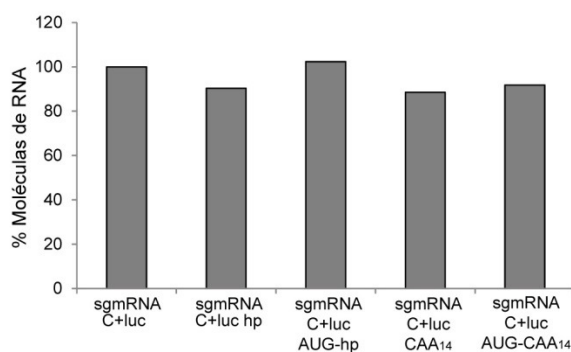


**Figura 23. Traducción dirigida por sgmRNAs de SINV con la L26S alterada, sintetizados *in vitro*.** Células BHK (A), MEFs PKR<sup>-/-</sup> (B) y C6/36 (C) fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 y sgmRNAs de SINV preparados *in vitro* (descripción en la figura 20 y en la tabla S3). A las 2 hpt, las células se recogieron en buffer de lisis y se determinó la actividad luc (paneles superiores). En paralelo, los productos de C se detectaron mediante Western blot con anticuerpos anti-proteína C de SINV (panel central). D) Se añadieron 100 ng de sgmRNAs (sintetizados *in vitro* con la RNA polimerasa T7) a RRL, que se incubaron durante 2 horas a 30°C para después estimar la actividad luc (panel superior). Las proteínas C sintetizadas a partir de los sgmRNAs de SINV se marcaron metabólicamente con [<sup>35</sup>S]Met-Cis y se examinaron mediante SDS-PAGE y autorradiografía (panel central). A-D) Los resultados de actividad luc se muestran como la media ± D.E. de tres experimentos representativos realizados por triplicado. En la gráfica se indican los valores porcentuales obtenidos al relacionar los sgmRNAs mutantes con el sgmRNA C+luc. Los paneles inferiores representan los porcentajes relativos de la proteína C auténtica y las proteínas C<sub>1</sub> o C<sub>2</sub> mutantes, cuantificadas mediante análisis de densitometría.

Dado que el sgmRNA de SINV puede interactuar directamente con el ribosoma en sistemas reconstituidos *in vitro* [13], nos pareció interesante estudiar la traducción de las diferentes variantes del sgmRNA C+luc en sistemas libres de células. Con este propósito, suplementamos RRL con cada uno de los sgmRNAs producidos *in vitro* y analizamos la síntesis de proteínas mediante marcaje radiactivo o determinando la actividad luc. Como se esperaba, el control sgmRNA C+luc sintetiza luc y C eficientemente



(Figura 23D, panel superior y central). De nuevo, la traducción del sgmRNA C+luc hp se ve restringida (97% inhibición) en este sistema, lo que apunta a que también es necesario un *scanning* para traducir el sgmRNA de SINV en RRL. Hay una recuperación parcial de la síntesis de luc con el sgmRNA C+luc AUG-hp, que se estimula en 13 veces en comparación con el sgmRNA C+luc hp, pero la síntesis de luc sigue inhibida en un 63% si se contrasta con el control wt (Figura 23D). También, en concordancia con los resultados anteriores, la síntesis de luc dirigida por el sgmRNA C+luc CAA<sub>14</sub> aumenta al 134%, mientras que se obtiene una actividad similar al control en el caso del sgmRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub>. En este sistema *in vitro*, los dos codones de iniciación presentes en los sgmRNAs se reconocen con eficiencias similares (aproximadamente 50% de iniciación en cada AUG), tanto en el sgmRNA C+luc AUG-hp como en el sgmRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub>. Nuevamente, la producción de proteína C a partir del sgmRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> disminuye en un 60% en comparación con el sgmRNA C+luc CAA<sub>14</sub>, lo que concuerda con una iniciación de la traducción a través de *scanning* en este sistema.



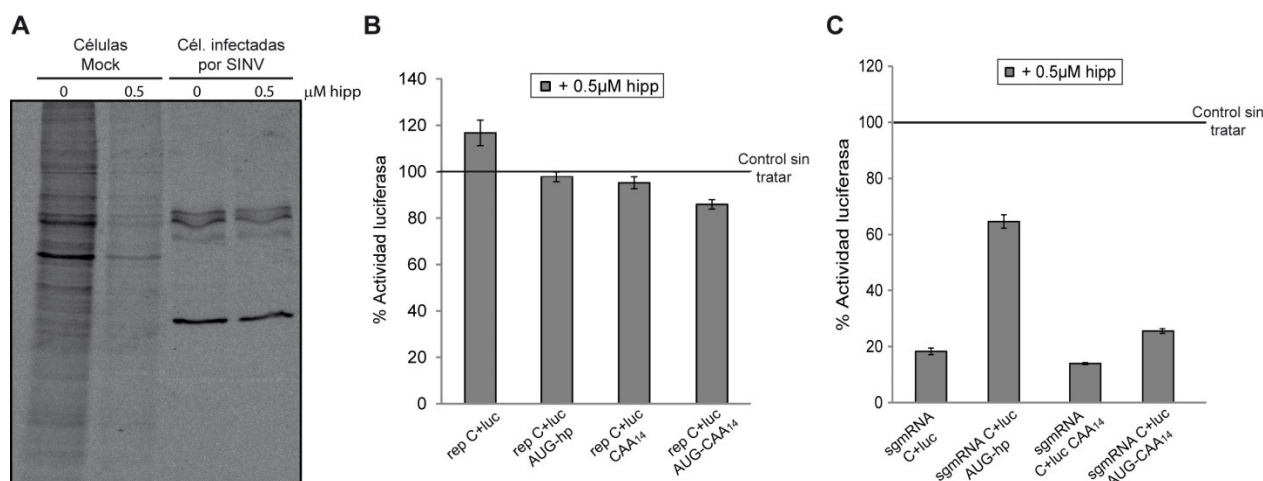
**Figura 24. Análisis de las cantidades de sgmRNA C+luc mediante qRT-PCR.** Se transfectaron células BHK con Lipofectamina 2000 y sgmRNAs C+luc de SINV preparados *in vitro*. Se aisló el RNA total a las 2 hpt y se usó como molde para cuantificar la cantidad de sgmRNA C+luc mediante qRT-PCR tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Las cantidades relativas de RNA de las variantes del sgmRNA C+luc se representan con respecto al sgmRNA C+luc wt.

#### 4.2.4. Participación del eIF4A en la traducción de diferentes sgmRNAs de SINV.

Hasta ahora, nuestros resultados demuestran que el *scanning* es el mecanismo que sigue el sgmRNA de SINV para iniciar su traducción. Por tanto, nos pareció de interés determinar si el eIF4A participa en el *scanning* de los diferentes sgmRNAs, tanto en el contexto de infección como fuera de él. Para ello volvemos a utilizar hipp, y estudiamos su efecto sobre la producción de luc en células BHK transfectadas. Como control del experimento, tratamos con 0.5  $\mu$ M hipp células BHK infectadas con SINV o no infectadas, y las marcamos con [<sup>35</sup>S]Met-Cis. Como se puede ver en la figura 25A, la traducción de los mRNAs celulares se inhibe drásticamente en presencia del compuesto, mientras que la síntesis de proteínas virales es resistente al bloqueo del eIF4A por hipp. La síntesis de luc de todos los replicones se ve reducida muy levemente en presencia de 0.5  $\mu$ M hipp (Figura 25B). Igualmente, en MEFs PKR<sup>-/-</sup>, el tratamiento con hipp no afecta a la producción de C derivada de la iniciación en los diferentes codones AUG en rep C+luc AUG-hp y rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> (Figura 26B, 26C y 26D). Por tanto, estos resultados revelan que el eIF4A no participa en el *scanning* o en la selección del AUG en el sgmRNA de SINV en células que expresan los replicones.



En células BHK transfectadas con los sgmRNAs aislados, previamente sintetizados *in vitro*, el hipp bloquea en un 70-80% la traducción de los diferentes mRNAs (Figura 25C), con la excepción del sgmRNA C+luc AUG-hp que se inhibe ~40%. Así, en estas condiciones el eIF4A sí se utiliza para iniciar la traducción de los sgmRNAs estudiados. De nuevo, los sgmRNAs de SINV con la L26S modificada manifiestan un mecanismo dual para su traducción, de forma que el requerimiento del eIF4A difiere entre las células que replican SINV y las que no.

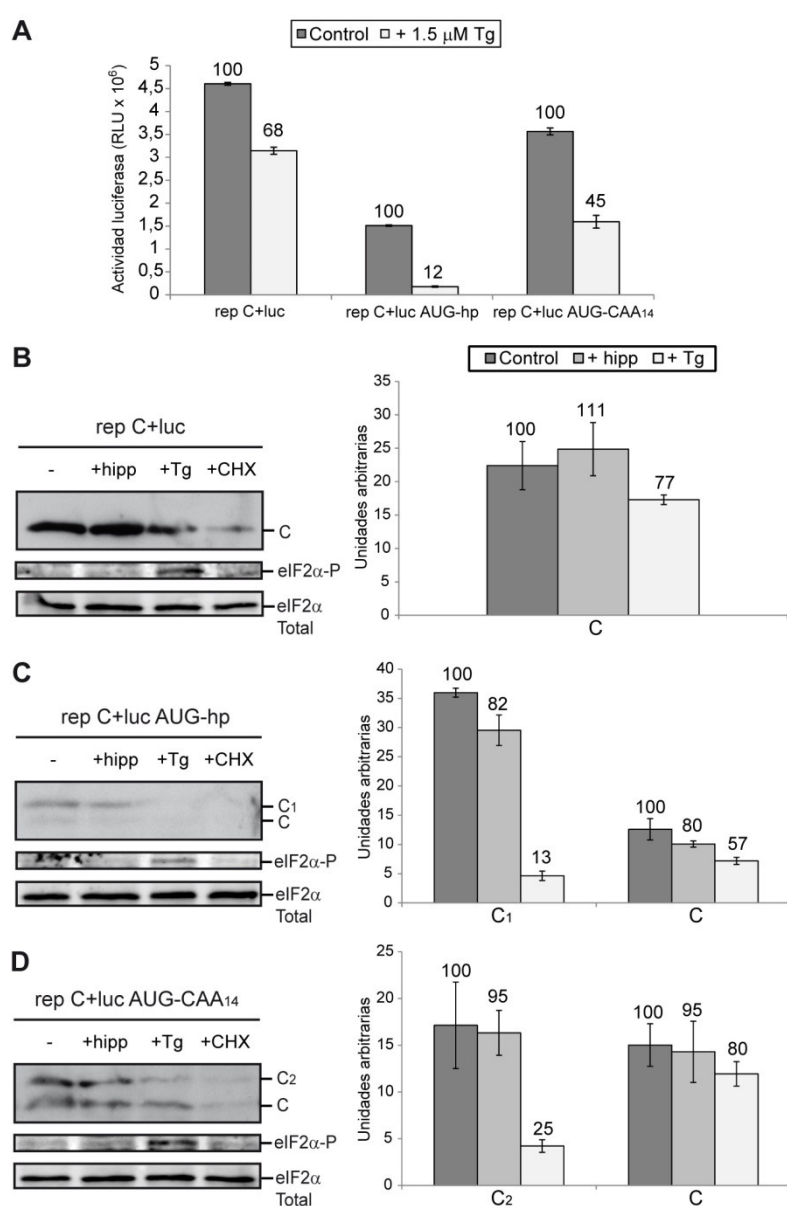


**Figura 25. Traducción de sgmRNAs de SINV tras la inhibición del eIF4A con hipp.** A) Se infectaron células BHK con SINV a 5 ufp/célula, o se dejaron sin infectar. A las 5.5 hpi se trataron con 0.5  $\mu$ M hipp durante 30 minutos, o se dejaron sin tratar. De 6 a 7 hpi, los cultivos se marcaron con [<sup>35</sup>S]Met-Cis en presencia o ausencia del inhibidor. Las muestras se procesaron mediante SDS-PAGE, seguido de autorradiografía. B, C) Se transfectaron células BHK con Lipofectamina 2000 y replicones de SINV transcritos *in vitro* (B) o sgmRNAs de SINV preparados *in vitro* (C). A las 5.5 hpt (B) o a los 30 minutos post-transfección (C), se añadieron a los cultivos 0.5  $\mu$ M hipp, 100  $\mu$ g/ml CHX o vehículo, y la incubación continuó durante 90 minutos antes de lisar las células para analizar la actividad luc. Los valores obtenidos en células tratadas con CHX sirvieron para sustraer la cantidad de luc sintetizada antes de añadir el hipp. Los resultados mostrados son porcentajes de los valores obtenidos en células tratadas con hipp en relación a las respectivas muestras sin tratar, y son la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes hechos por triplicado.

#### 4.2.5. Implicación del eIF2 en la selección del AUG

Puesto que dos de nuestras construcciones dan lugar a sgmRNAs con dos codones de iniciación funcionales (sgmRNA AUG-hp y sgmRNA AUG-CAA<sub>14</sub>, ver Figura 20) y la selección de los codones difiere entre células BHK y MEFs PKR<sup>-/-</sup>, nos pareció interesante conocer si esta diferencia se debía a la fosforilación del eIF2 $\alpha$  y si la iniciación de la traducción en estos dos AUGs podría ocurrir con eIF2 inactivado. Para comprobarlo, en primer lugar transfectamos los replicones en MEFs PKR<sup>-/-</sup> y después tratamos las células con Tg, que induce la fosforilación de eIF2 $\alpha$  a través de una ruta independiente de PKR [159,160]. Finalmente, analizamos la producción de luc midiendo actividad luc y de C mediante *Western blot*. Además, pusimos un control de CHX para saber la cantidad de luc y C sintetizada antes de agregar la Tg. El tratamiento con Tg tiene un efecto moderado sobre la síntesis de luc dirigida por el control rep C+luc (~30%), mientras que inhibe profundamente (90%) la producción de luc de rep C+luc AUG-hp, y un 55% la de rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> (Figura 26A). Además, la síntesis de C a partir de rep C+luc disminuye ligeramente tras la fosforilación del eIF2 $\alpha$  inducida por Tg (Figura 26B). En células transfectadas con rep

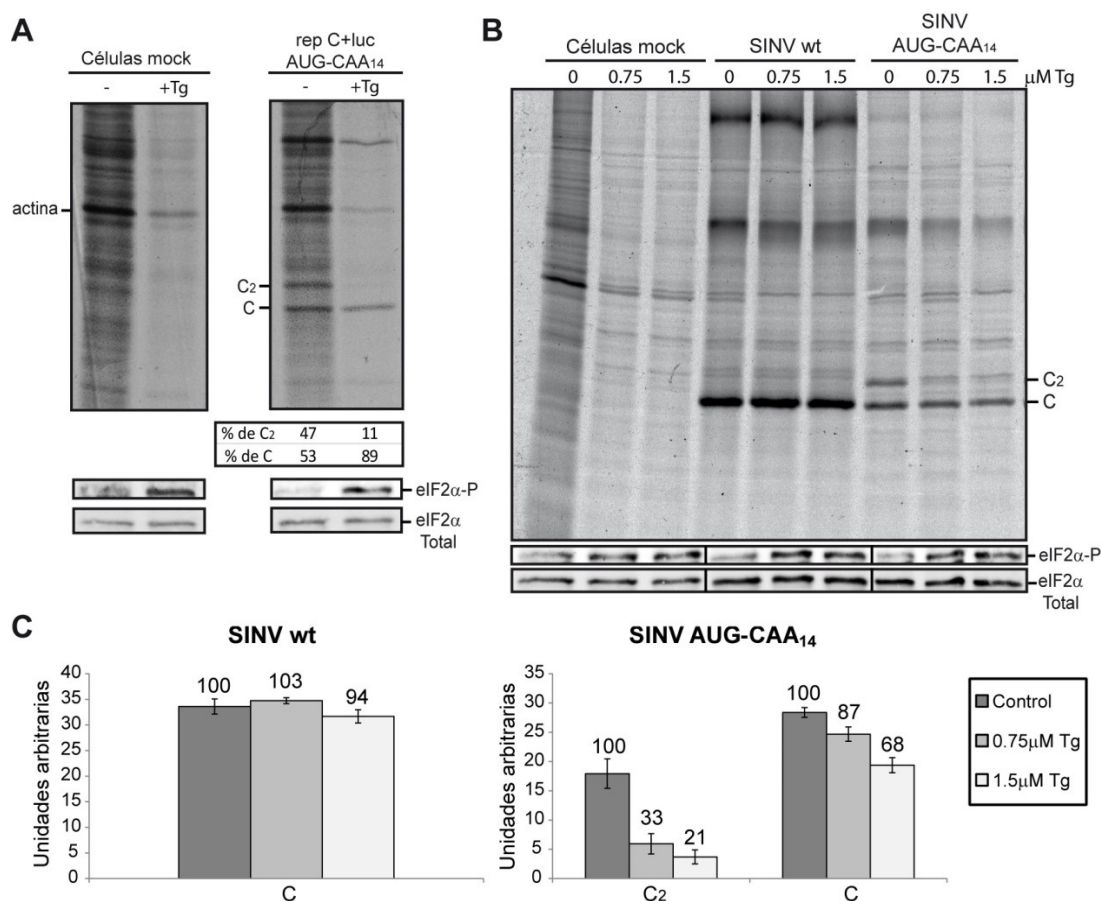
C+luc AUG-hp, la síntesis de proteínas iniciada en el primer AUG, que se selecciona mayoritariamente en MEFs  $PKR^{-/-}$  (ver Figura 22C y 26C), se bloquea profundamente (87% inhibición, Figura 26C). En cambio, la traducción de rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> da lugar a cantidades equivalentes de las dos proteínas C distintas (Figura 26D). En este caso, el tratamiento con Tg inhibe diferencialmente la traducción de cada proteína C tal y como se aprecia en la figura 26D: la síntesis de proteínas que inicia en el primer codón AUG se ve reducida significativamente (en un 75% con respecto a las células sin tratar), mientras que la traducción continúa en el codón AUG auténtico (sólo 20% inhibición). Por lo tanto, el patrón de selección del AUG en MEFs  $PKR^{-/-}$  se modifica tras la inactivación del eIF2. Por otra parte, el hipp tiene poco efecto sobre la síntesis de C en este sistema (Figura 26B, 26C y 26D), en concordancia con los resultados descritos arriba.



**Figura 26. Selección del codón de iniciación AUG tras la fosforilación del eIF2 $\alpha$  inducida por Tg.** Se transfectaron MEFs  $PKR^{-/-}$  con Lipofectamina 2000 y rep C+luc, rep C+luc AUG-hp o rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub>. A las 3.5 hpt, se trataron las células con 1.5 μM Tg ó 100 μg/ml CHX durante 90 minutos, o se dejaron sin tratar. A continuación se lisaron las células con buffer de lisis y se midió la actividad luc. Los valores obtenidos en células tratadas con CHX se usaron para restar la cantidad de luc producida antes de la adición de Tg. B-D) Se transfectaron y trataron MEFs  $PKR^{-/-}$  como en (A), incluyendo hipp a 0.5 μM. Después, se recogieron las células en buffer *sample* y se analizaron las muestras mediante inmunoblot (paneles izquierdos) con anticuerpos específicos anti-proteína C, anti-eIF2 $\alpha$  fosforilado (eIF2 $\alpha$ -P) y anti-eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$  Total). La síntesis de proteína C y proteínas mutantes C<sub>1</sub> o C<sub>2</sub> en presencia de los inhibidores se cuantificó mediante densitometría (paneles derechos). Los valores de las células tratadas con CHX sirvieron para sustraer la cantidad de proteína sintetizada antes de añadir hipp o Tg. Los resultados mostrados en A-D son la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. En las gráficas se indican también los porcentajes obtenidos al comparar las células tratadas con hipp o Tg y las respectivas muestras sin tratar.

Para reforzar el análisis de la síntesis de C, llevamos a cabo también un marcaje radiactivo siguiendo dos aproximaciones diferentes. En primer lugar, transfectamos MEFs  $PKR^{-/-}$  con el replicón rep C+luc AUG-

CAA<sub>14</sub>. Tras 4 horas y 15 minutos de incubación, tratamos las células con 1.5  $\mu$ M Tg durante 15 minutos y después las marcamos radiactivamente durante 30 minutos en presencia del inhibidor. La proporción de proteína mutante C<sub>2</sub> y proteína C genuina sintetizadas en las células sin tratar con el compuesto es de 47% y 53%, respectivamente (Figura 27A). Cabe destacar que esta proporción cambia drásticamente en presencia de Tg, alcanzando un porcentaje de 11% y 89%, respectivamente.

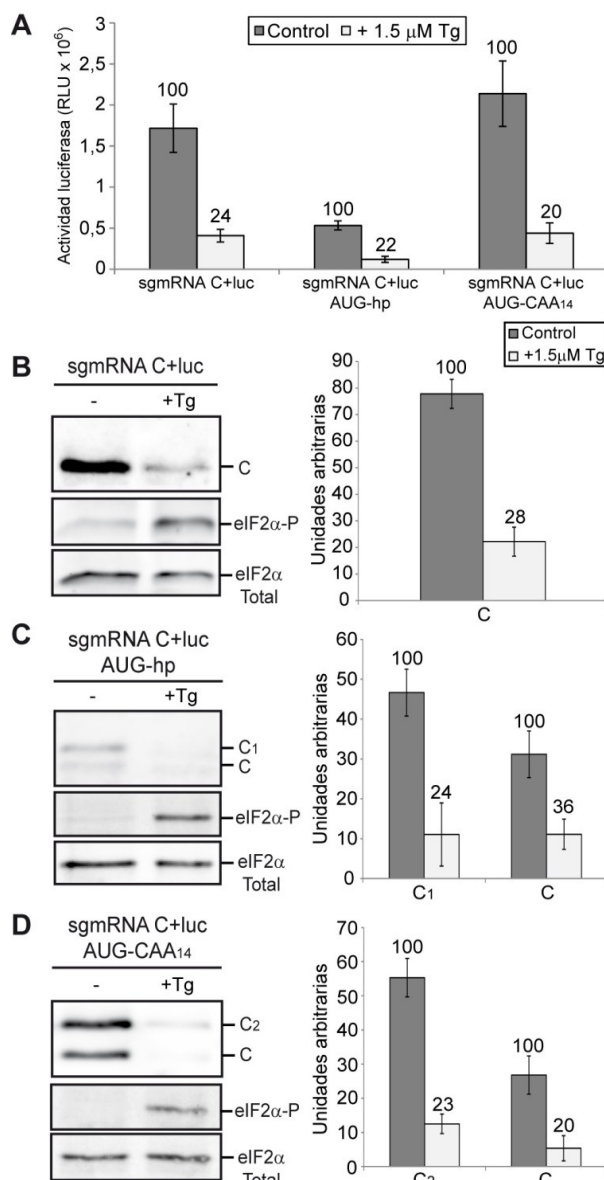


**Figura 27. Influencia de la fosforilación del eIF2 $\alpha$  en la selección del codón AUG en el sgRNA AUG-CAA<sub>14</sub>.** A) Se transfectaron MEFs PKR<sup>-/-</sup> con Lipofectamina 2000 y rep C+Luc AUG-CAA<sub>14</sub>. A las 4 h 15 min post-transfección, se trataron las células con 1.5  $\mu$ M Tg durante 15 minutos o se dejaron sin tratar. Las células se marcaron durante 30 minutos con [<sup>35</sup>S]Met-Cis en ausencia o presencia del compuesto. Las proteínas marcadas radiactivamente se separaron mediante SDS-PAGE seguido de autorradiografía. Las mismas muestras se usaron para analizar el eIF2 $\alpha$  fosforilado y el eIF2 $\alpha$  total mediante Western blot. Los porcentajes relativos de proteína C y proteína mutante C<sub>2</sub> se calcularon mediante densitometría. B) Se infectaron MEFs PKR<sup>-/-</sup> con SINV wt o SINV AUG-CAA<sub>14</sub> a una multiplicidad de 5 ufp/célula. A las 4 h 15 min post-infección, las células se pre-trataron con Tg a las concentraciones indicadas durante 15 minutos y después se marcaron radiactivamente con [<sup>35</sup>S]Met-Cis durante 30 minutos en ausencia o presencia del inhibidor a las mismas concentraciones. Los extractos celulares se analizaron mediante SDS-PAGE y autorradiografía. Una alícuota de la misma muestra se usó para analizar la fosforilación del eIF2 $\alpha$  mediante Western blot. C) La síntesis de las variantes de C se examinó mediante el análisis densitométrico de las películas fotográficas mostradas en el panel B. Se indican sobre las barras los porcentajes calculados al comparar las células tratadas con Tg y las células sin tratar.

La segunda aproximación consistió en obtener un virus recombinante con la L26S del sgRNA AUG-CAA<sub>14</sub> (ver detalles en la figura 20A). Posteriormente, infectamos MEFs PKR<sup>-/-</sup> con SINV wt y con el mutante SINV AUG-CAA<sub>14</sub> a una multiplicidad de 5 ufp por célula, y a las 4 horas 15 minutos post-infección tratamos las células durante 45 minutos con 0.75 ó 1.5  $\mu$ M Tg. Como se muestra en la figura 27B, el tratamiento con Tg bloquea profundamente la traducción celular. Además, la inducción de la fosforilación

del eIF2 $\alpha$  resulta en una significativa reducción de la traducción viral desde el codón AUG insertado (67% y 79% de inhibición en células tratadas con 0.75 y 1.5  $\mu$ M Tg, respectivamente), mientras que la síntesis de proteínas desde el codón AUG genuino apenas se ve afectada en células infectadas con SINV AUG-CAA<sub>14</sub>, igual que el control SINV wt (Figura 27B y 27C). La inducción de la fosforilación del eIF2 $\alpha$ , así como el eIF2 $\alpha$  total, se comprobó mediante *Western blot* (Figura 27A y 27B, paneles centrales e inferiores). Como se observa, la fosforilación del eIF2 $\alpha$  es evidente en las células tratadas con Tg. Como conclusión, se vuelve a apreciar de nuevo que la selección del AUG depende del estado de fosforilación del eIF2 $\alpha$ .

A continuación examinamos si la inactivación del eIF2 afecta a la iniciación de la traducción y a la selección del AUG de los correspondientes sgRNAs fuera del contexto de replicación. Para ello, transfectamos MEFs PKR<sup>-/-</sup> con los siguientes mRNAs sintetizados *in vitro*: sgRNA C+luc, sgRNA C+luc AUG-hp y sgRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub>. Luego, inducimos la fosforilación del eIF2 $\alpha$  con 1.5  $\mu$ M Tg y detectamos la síntesis de luc midiendo actividad luc y también la producción de C por *Western blot*.



**Figura 28. Efecto del tratamiento con Tg en MEFs PKR<sup>-/-</sup> transfectadas con sgRNAs de SINV sintetizados *in vitro*.** A) Mediante transcripción *in vitro* usando la RNA polimerasa T7, se sintetizaron sgRNA C+luc, sgRNA C+luc AUG-hp y sgRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub>, y posteriormente se transfectaron en MEFs PKR<sup>-/-</sup>. 30 minutos después, las células se trataron con 1.5  $\mu$ M Tg o se dejaron sin tratar, y se incubaron durante 90 minutos antes de ser recolectadas para medir la actividad luc. B-D) Se transfectaron y trataron MEFs PKR<sup>-/-</sup> como en (A), y después se recogieron en buffer *sample*. Se detectaron la proteína C de SINV, el eIF2 $\alpha$  fosforilado y el eIF2 $\alpha$  total mediante inmunoblot usando anticuerpos específicos (paneles izquierdos). En los paneles derechos se muestran las cuantificaciones densitométricas de la proteína C y de las proteínas mutantes C<sub>1</sub> o C<sub>2</sub> en presencia o ausencia de Tg. Los resultados representados en los paneles A-D son la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los números sobre las barras indican los porcentajes calculados a partir de los valores obtenidos en células tratadas con Tg en relación a las células sin tratar.

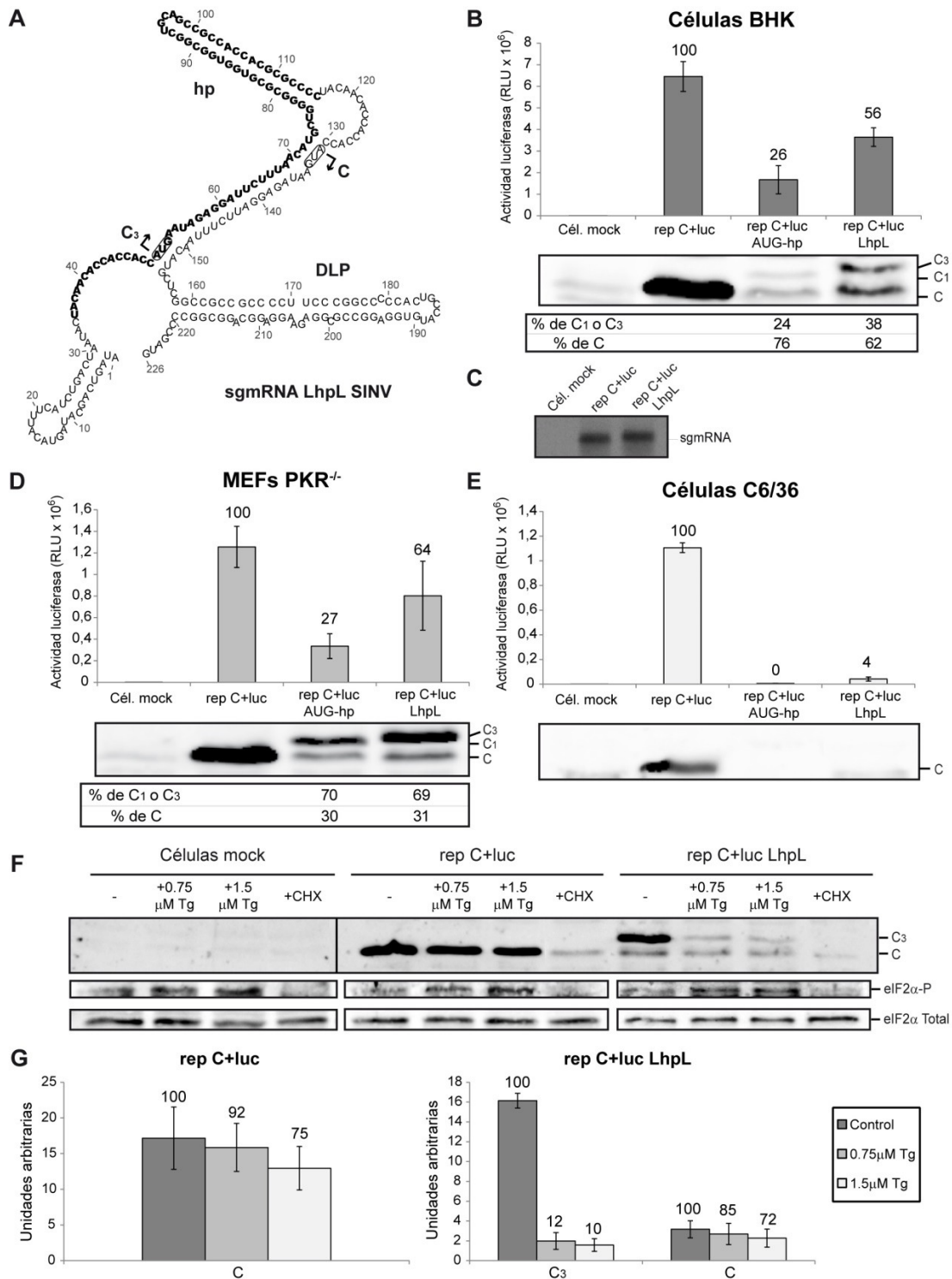
En presencia del inhibidor, la actividad luc se reduce en un 76%, 78% y 80%, respectivamente, para cada uno de los mRNAs testados (Figura 28A). Este resultado concuerda con un experimento previo realizado en células BHK, en las cuales disminuye fuertemente la traducción del sgRNA C+luc al tratar con Ars [12]. El análisis de la producción de C revela que la síntesis de la proteína C genuina se bloquea tras la fosforilación del eIF2 $\alpha$  en los tres sgRNAs probados (Figura 28B, 28C y 28D), y lo mismo ocurre con la síntesis de la proteína C<sub>1</sub> a partir del sgRNA C+luc AUG-hp y de la proteína C<sub>2</sub> a partir del sgRNA C+luc AUG-CAA<sub>14</sub> (Figura 28C y 28D, respectivamente). Por tanto, en estas condiciones experimentales, el eIF2 es indispensable para la iniciación de la traducción desde los dos codones AUG estudiados.

En resumen, nuestros resultados sugieren que los sgRNAs de SINV que contienen dos codones de iniciación se traducen de manera diferente con respecto a la utilización del eIF2 en las células donde replica SINV: el primer AUG requiere el eIF2 activo, mientras que el segundo AUG no y es seleccionado en presencia del eIF2 fosforilado. De este modo, el *scanning* de la L26S y la selección del segundo codón de iniciación AUG se pueden producir aun cuando el eIF2 $\alpha$  se encuentra altamente fosforilado en un contexto de infección viral. Por el contrario, en células en las que no replica SINV, el eIF2 es necesario para el *scanning* del sgRNA de SINV y para la iniciación en ambos AUGs.

#### 4.2.6. Influencia de la estructura DLP y de la L26S de SINV en la traducción independiente del eIF2

Como se ha indicado previamente, la estructura DLP confiere independencia del eIF2 para la traducción del sgRNA. Existen estudios que han sugerido que la horquilla DLP reduce el movimiento de los ribosomas, permitiéndoles iniciar la traducción con cantidades limitantes del eIF2 [106,111]. Si esto fuera así, la estructura en horquilla insertada en la construcción rep C+luc AUG-hp también debería conferir independencia del eIF2, pero en cambio observamos una inhibición de la síntesis de proteínas empezando desde el codón AUG situado antes de la horquilla tras la inactivación del eIF2. No obstante, la secuencia de nucleótidos que rodea al primer AUG en esta construcción difiere de la que rodea al codón de iniciación genuino. Para poder estudiar si el mecanismo propuesto para la traducción eIF2-independiente es cierto, decidimos generar una nueva construcción denominada sgRNA LhpL SINV (Figura 29A) que contiene los primeros 75 nucleótidos del sgRNA de SINV, seguidos de una horquilla *hp* situada a 23 nucleótidos del codón AUG, y que está ahora en su contexto de secuencia auténtico. Después de la horquilla *hp*, y precediendo a la estructura DLP, hay una duplicación de los nucleótidos 35-75 con un segundo codón AUG a una distancia de 24 nucleótidos con respecto a la horquilla DLP. Este replicón lo transfectamos en células BHK, MEFs PKR<sup>-/-</sup> y C6/36 para estimar a los tiempos post-transfección indicados la actividad luc y la síntesis de C. Como controles, utilizamos los replicones rep C+luc y rep C+luc AUG-hp.





**Figura 29. Capacidad de *hp* y DLP para conferir independencia del eIF2.** A) Predicción de estructura secundaria del sgRNA mutante LhpL. Ver leyenda de la figura 20A. B-E) Se transfectaron células BHK (B, C), MEFs PKR<sup>-/-</sup> (D) y C6/36 (E) con Lipofectamina 2000 y los replicones indicados transcritos *in vitro*. A las 7, 5 u 8 hpt, respectivamente, se procesaron las células para medir la actividad luc o para detectar el sgRNA como se describe en la figura 21D y 21F (panel C). Los valores se representan como la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos diferentes; en las gráficas se indican los porcentajes calculados al comparar los replicones mutantes con el control rep C+luc (B, D y E, paneles superiores). En paralelo se analizó la producción de C de SINV mediante *Western blot* (B y D, panel central, y E, panel inferior). Los porcentajes relativos de proteína C genuina y las proteínas mutantes C<sub>1</sub> y C<sub>3</sub> se estimaron mediante densitometría (B y D, paneles inferiores). F) Se transfectaron MEFs PKR<sup>-/-</sup> con rep C+luc o rep C+luc LhpL. A las 3.5 hpt se trataron las células con Tg a las concentraciones indicadas o con 100  $\mu$ g/ml CHX durante 90 minutos; después, se recogieron en buffer *sample* y se analizaron mediante inmunoblot con anticuerpos anti-proteína C, anti-eIF2 $\alpha$  fosforilado (eIF2 $\alpha$ -P) y anti-eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$  total). G) Se examinó la cantidad de proteína C y de proteína mutante C<sub>3</sub> producidas en presencia de Tg a través de la densitometría de la película fotográfica mostrada en el panel F. Los valores obtenidos en células tratadas con CHX sirvieron para sustraer la cantidad de proteína sintetizada antes de la adición de Tg. En la gráfica se indican los valores porcentuales obtenidos en las células tratadas con Tg en relación a las células sin tratar.

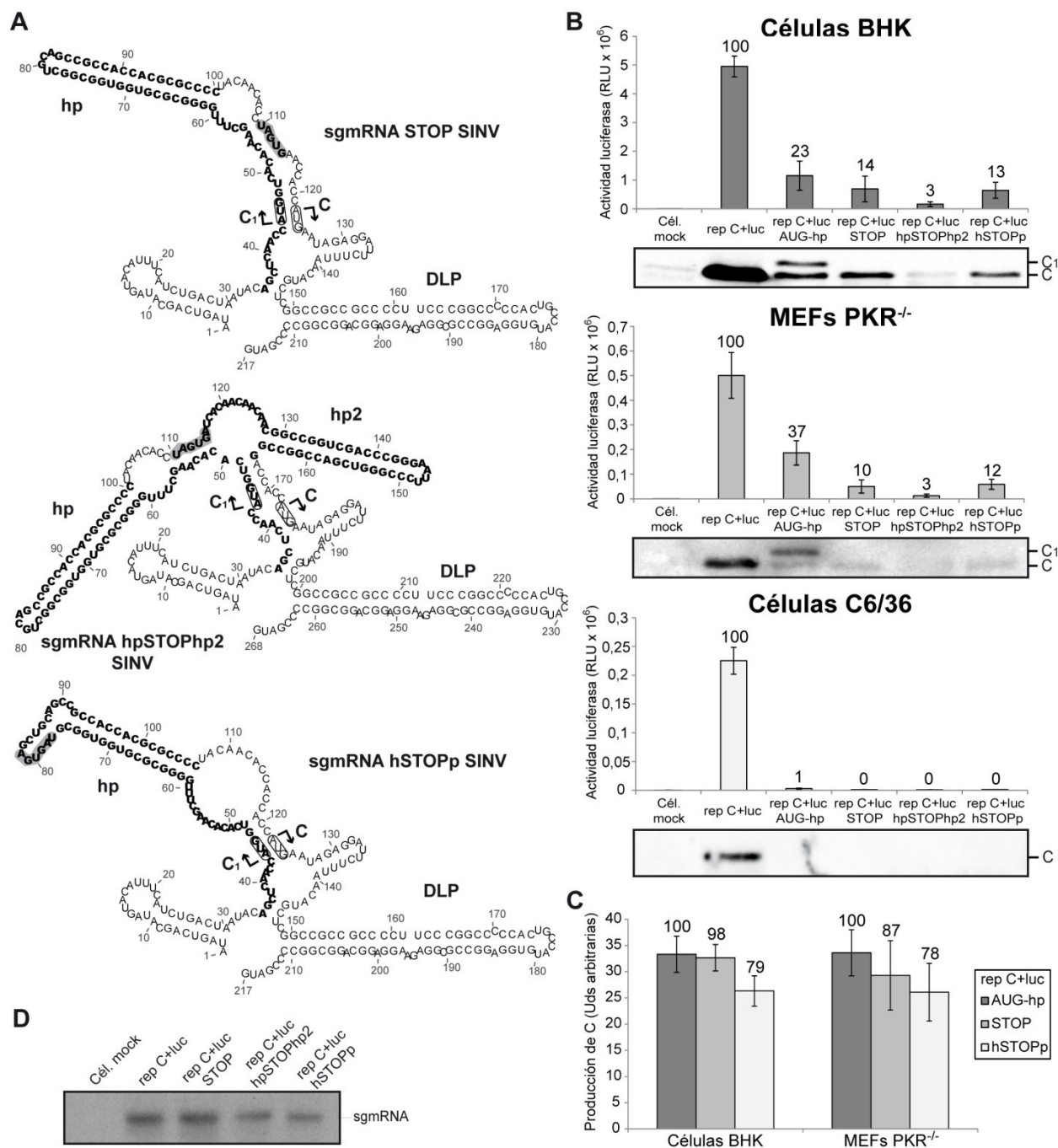
La actividad luc producida a partir de rep C+luc LhpL en células BHK es 2.2 veces superior a la obtenida con rep C+luc AUG-hp, pero aproximadamente un 44% menor que la de rep C+luc (Figura 29B). Este dato no se debe a diferencias de producción de sgmRNA, como se muestra en la Figura 29C. Se obtienen resultados similares en MEFs PKR<sup>-/-</sup> (estimulación de 2.4 veces respecto a rep C+luc AUG-hp, y ~64% de actividad en comparación con rep C+luc, Figura 29D). Sin embargo, la producción de las distintas variantes de C difiere entre líneas celulares: en células BHK, el segundo codón AUG se selecciona preferentemente, como se observa con los otros replicones (ver Figura 21A), mientras que en MEFs PKR<sup>-/-</sup> la traducción empieza principalmente desde el primer AUG (como se ve con las otras construcciones, Figura 22C y 26C). Además, la construcción rep C+luc LhpL no es operativa en células C6/36, ya que la actividad luc es ~4% de la obtenida con el control rep C+luc (Figura 29E). Por otra parte, para evaluar si el *hp* insertado puede conferir independencia del eIF2 en este nuevo contexto, transfectamos MEFs PKR<sup>-/-</sup> con el replicón rep C+luc LhpL y las tratamos con Tg para inducir la fosforilación del eIF2 $\alpha$ . Como se muestra en la figura 29F, la iniciación de la traducción en el primer AUG se bloquea al tratar con Tg (inhibición del 88% y 90% en células tratadas con 0.75 y 1.5  $\mu$ M Tg, respectivamente, Figura 29G), mientras que la iniciación en el codón AUG genuino no se ve afectada por el inhibidor en el control rep C+luc y en rep C+luc LhpL. Colectivamente, estos resultados sugieren que la horquilla *hp* insertada no se comporta de manera similar a la estructura DLP con respecto a la selección del AUG y a la traducción independiente del eIF2. Por consiguiente, estos resultados no respaldan el modelo que propone que el elemento DLP confiere independencia del eIF2 simplemente mediante la desaceleración del movimiento de los ribosomas.

#### 4.2.7. El *shunting* ribosomal no es operativo en el sgmRNA AUG-hp de SIN V

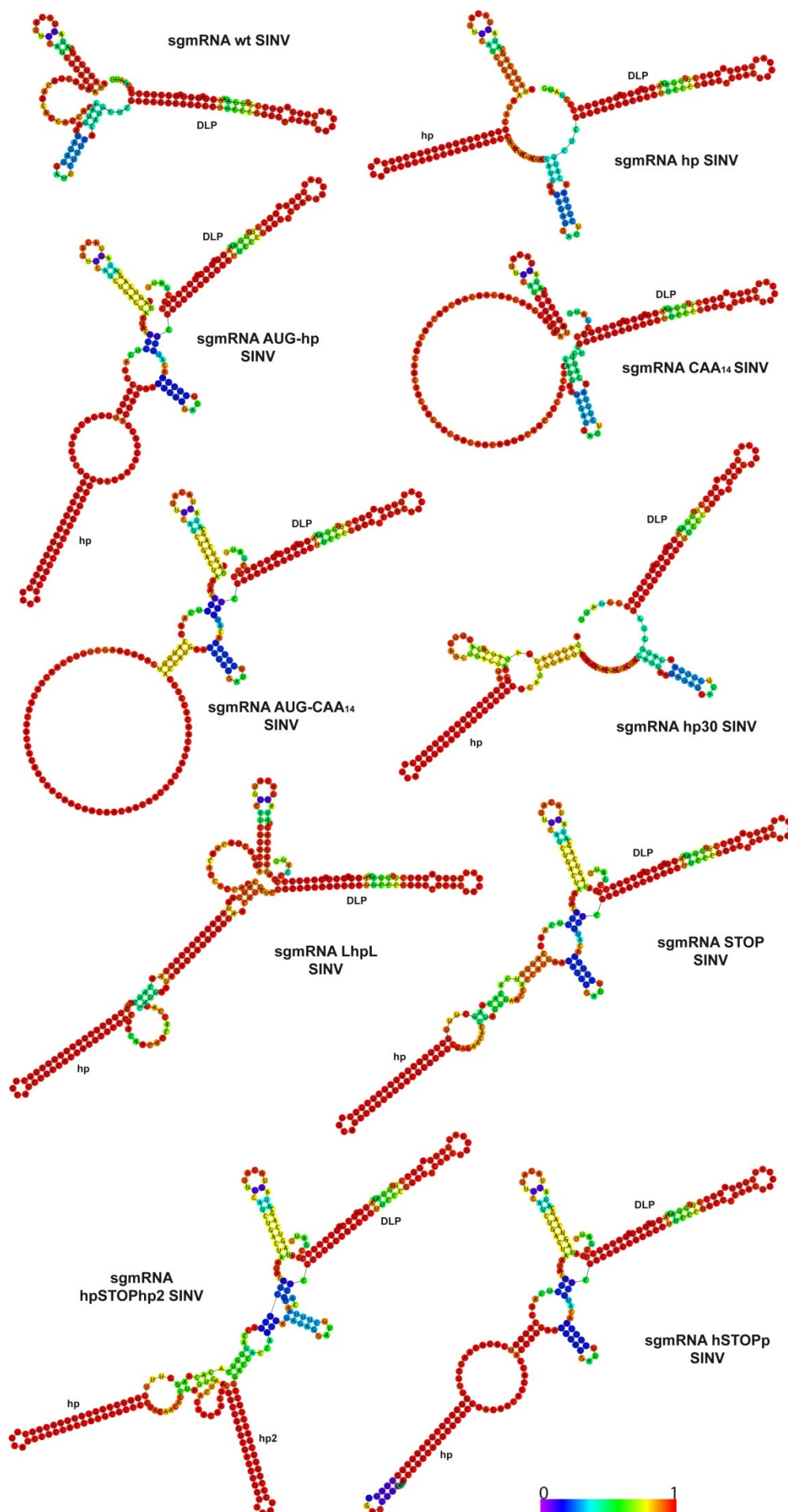
Ciertos mRNAs pueden ser traducidos mediante un mecanismo de salto o *shunting*, que implica la translocación directa del complejo de preiniciación desde la estructura cap hasta el codón AUG de iniciación [77]. Indudablemente, el *shunting* ribosomal no es el mecanismo operativo en el sgmRNA de SIN V, ya que la síntesis de proteínas dirigida por el sgmRNA hp está suprimida. Sin embargo, en los sgmRNAs que llevan dos codones de iniciación, hay ocasiones en las que ambos AUGs se usan para iniciar la traducción. En el caso del sgmRNA AUG-hp, un posible motivo es que una parte de los complejos de iniciación 80S presentes en el primer AUG se transloquen directamente hasta el segundo AUG sin *scanning*. Un segundo mecanismo viable podría ser que los ribosomas 80S, que han iniciado la traducción desde el primer AUG, sean capaces de desenrollar la horquilla durante la elongación. Esto podría ser aprovechado por los complejos de preiniciación que vienen detrás de los ribosomas 80S para pasar a través de la horquilla aplanada e iniciar la síntesis de proteínas desde el siguiente AUG. Para distinguir entre estas dos posibilidades, diseñamos varias construcciones adicionales mediante la modificación del sgmRNA AUG-hp SIN V (Figura 30A). En la primera construcción introdujimos dos codones de parada 9 nucleótidos después de la horquilla *hp* (sgmRNA STOP SIN V). La segunda construcción incluye una segunda horquilla *hp2* ( $\Delta$ G de -42.9 kcal/mol) tras los codones de parada (sgmRNA hpSTOPhp2 SIN V), que detendría los complejos de preiniciación que vienen

detrás de los ribosomas en elongación, en el caso de que este evento tenga lugar. La tercera construcción contiene dos codones de parada dentro de la horquilla *hp* (sgmRNA hSTOPp SINV). En la figura 31 se muestran las estructuras secundarias de estos sgmRNAs (incluyendo también todas las demás construcciones de SINV descritas), con un código de colores que indica la probabilidad de las predicciones obtenidas con *RNAfold*. Transfectamos los tres replicones independientemente en células BHK, MEFs PKR<sup>-/-</sup> y C6/36, y medimos seguidamente la actividad luc. También examinamos la producción de C mediante inmunoblot. Los resultados de actividad luc muestran que los replicones rep C+luc STOP, rep C+luc hpSTOPhp2 y rep C+luc hSTOPp están inhibidos severamente en las tres líneas celulares, en comparación con el control rep C+luc: 86%, 97% y 87% de inhibición, respectivamente, en células BHK; 90%, 97% y 88% de inhibición en MEFs PKR<sup>-/-</sup>; 99.6%, 99.7% y 99.5% de inhibición en células de mosquito (Figura 30B). Además, se detecta una única forma de C, aunque a niveles muy bajos, en el caso de los nuevos replicones rep C+luc STOP y rep C+luc hSTOPp en células BHK y MEFs PKR<sup>-/-</sup>, que corresponde a la proteína C sintetizada desde el codón AUG auténtico (Figura 30B). Formas de C mayores, producidas a partir del primer codón de iniciación, no se pueden detectar, lo que indica que la traducción debe finalizar en los codones de terminación correspondientes. También, las cantidades de proteína C genuina son similares a las producidas por la construcción parental rep C+luc AUG-hp (sólo 2-13% y 21-22% de inhibición en el caso de rep C+luc STOP y rep C+luc hSTOPp, respectivamente, Figura 30C). Por tanto, la presencia de los codones de STOP tiene poco efecto sobre la iniciación en el AUG genuino. Por otra parte, la presencia de una segunda horquilla después de los codones de parada (rep C+luc hpSTOPhp2) restringe aún más la producción de C (Figura 30B). Esta potente reducción en la síntesis de luc y de C no se debe a variaciones en las cantidades de sgmRNA, como se muestra en la figura 30D. En su conjunto, estos resultados descartan la existencia de un mecanismo de *shunting* para la iniciación de la traducción del sgmRNA AUG-hp y son consistentes con un proceso de *scanning*. Además, sugieren que la desestructuración de la horquilla *hp* por los ribosomas 80S en elongación facilitaría que los complejos de preiniciación alcancen el codón AUG auténtico en la construcción sgmRNA AUG-hp SINV.





**Figura 30. Traducción de sgRNAs de SINV que contienen codones de terminación en diferentes posiciones.** A) Predicción con *RNAfold* de la estructura secundaria de las 5'-UTRs de los RNAs (ver leyenda en figura 20A). B) Células BHK (panel superior), MEFs PKR<sup>-/-</sup> (panel central) y C6/36 (panel inferior) fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 y los replicones de SINV correspondientes, previamente transcritos *in vitro*. 7, 5 u 8 horas después, respectivamente, se recogieron las células para medir la actividad luc. Los valores se plasman en las gráficas como medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. En las gráficas se indican además los porcentajes obtenidos al comparar los replicones mutantes y el control rep C+luc. La acumulación de proteína C de SINV se analizó en paralelo mediante *Western blot* usando un anticuerpo específico anti-proteína C. C) Las cantidades de proteína C genuina fueron cuantificadas mediante densitometría. Los valores obtenidos se representan como medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos representativos. Los números sobre las barras indican los valores porcentuales obtenidos con rep C+luc STOP y rep C+luc hSTOPp en relación a rep C+luc AUG-hp. D) Síntesis de sgmRNA en células BHK transfectadas con los diferentes replicones de SINV y procesadas según se indica en la Figura 21D y 21F.



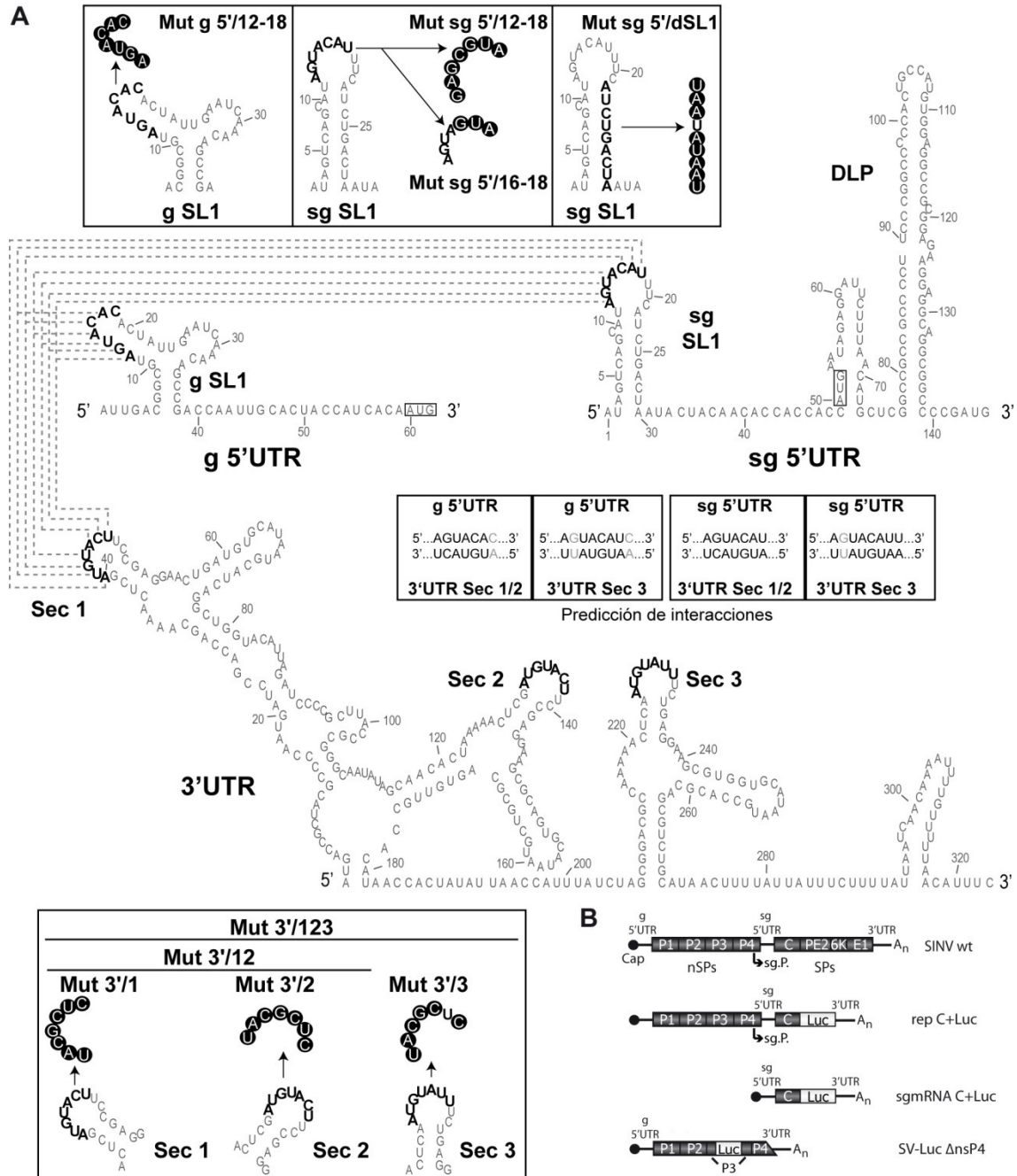
**Figura 31. Probabilidades de apareamientos de bases en los extremos 5' de diferentes sgRNAs de SINV.**

Estructuras secundarias de mínima energía libre, generadas mediante el programa *RNAfold* para cada una de las L26S de los diferentes sgRNAs de SINV descritos en este apartado. Las estructuras predichas se colorean según las probabilidades de apareamiento entre bases. Las bases desaparejadas se colorean según la probabilidad de permanecer sin aparear.

### 4.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS REPETIDAS SITUADAS EN LA ZONA 3'-UTR DE LOS mRNAs DE SIN V

#### 4.3.1. Mutación de los motivos presentes en la 3'-UTR de los mRNAs de SIN V. Efectos en la traducción del gmRNA

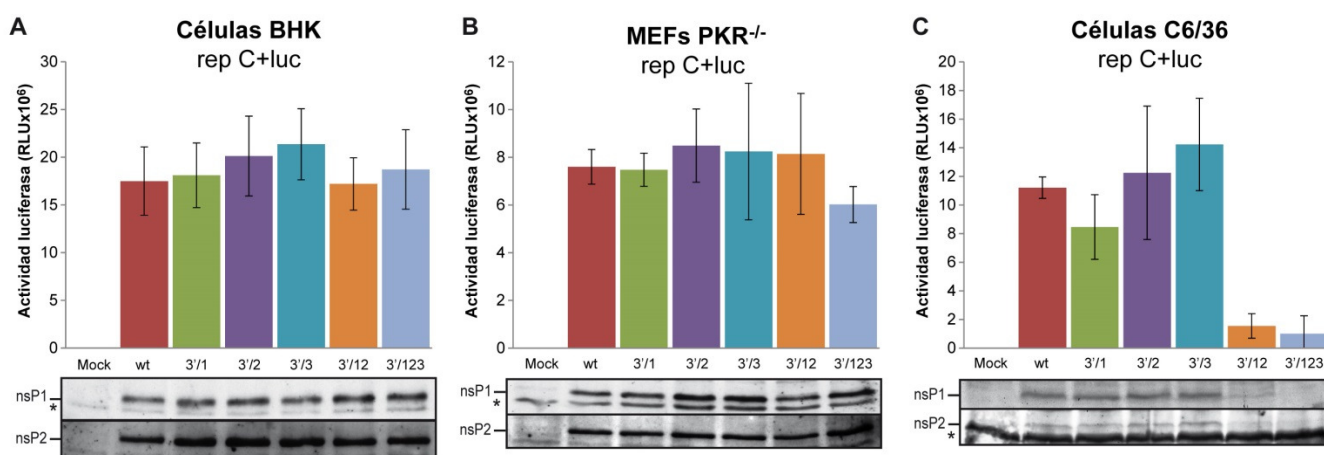
Analizando las regiones 5' y 3'-UTRs de SIN V observamos que algunos de los nucleótidos presentes en el lazo de las estructuras con forma de tallo-lazo (denominadas SL1, de *stem-loop 1*) localizadas en las 5'-UTRs del gmRNA y sgmRNA son complementarios a nucleótidos situados en tres lazos repetidos (Sec 1, Sec 2 y Sec 3) de la 3'-UTR del genoma del virus y cuya función no se ha descrito todavía (ver esquema en la Figura 32). Previamente se había observado mediante microscopía electrónica que el genoma de SIN V circulariza [161,162], y además se ha propuesto que los extremos 5' y 3' del gmRNA interaccionan, lo que contribuye a la replicación del virus [163]. Para estudiar la función de estas secuencias empleamos, como base, el replicón rep C+luc (Figura 32B) y sobre él diseñamos cinco variantes (Figura 32A) con mutaciones en cada una de las secuencias 1, 2 y 3 de la 3'-UTR (rep C+luc 3'/1, rep C+luc 3'/2 y rep C+luc 3'/3, respectivamente), o en las secuencias 1+2 (rep C+luc 3'/12) ó 1+2+3 (rep C+luc 3'/123). A continuación, sintetizamos estos replicones *in vitro* usando la RNA polimerasa T7, los transfectamos en dos líneas celulares de mamífero (células BHK y MEFs PKR<sup>-/-</sup>) y determinamos la actividad luc producida a partir de sus sgmRNAs. Además, para evaluar el efecto de las mutaciones sobre el funcionamiento del gmRNA, decidimos analizar también la producción de dos proteínas virales tempranas, nsP1 y nsP2, mediante inmunoblot. En las figuras 33A y 33B (paneles superiores) se puede apreciar que ninguno de los mutantes da lugar a variaciones mayores de un 20% en la actividad luc con respecto al control rep C+luc wt, en ambas líneas celulares. Las cantidades de nsP1 y nsP2 sintetizadas son también similares en todos los replicones (Figura 33A y 33B, paneles inferiores). De este modo, podemos decir que las mutaciones en esta región de la 3'-UTR del replicón de SIN V rep C+luc tiene poco efecto sobre la síntesis de proteínas dirigida por el gmRNA y el sgmRNA en células de mamífero. Puesto que se ha sugerido que la 3'-UTR del virus Chikungunya es importante en la adaptación selectiva a células de insecto, pero no de mamífero [164,165], pensamos que sería interesante examinar el efecto de las mutaciones en la 3'-UTR en células de mosquito, que es el otro huésped natural de los alfavirus. Por tanto, probamos los replicones mutantes en células C6/36 de *Aedes albopictus* siguiendo el mismo procedimiento que antes. En comparación con rep C+luc wt, la síntesis de luc es ligeramente menor con rep C+luc 3'/1 (24% inhibición) y algo mayor con rep C+luc 3'/2 (9% estimulación) y rep C+luc 3'/3 (26% estimulación) a las 8 hpt (Figura 33C, panel superior). En cambio, la producción de luc se reduce severamente cuando se introducen mutaciones dobles (rep C+luc 3'/12, 86% inhibición) o triples (rep C+luc 3'/123, 91% inhibición) en la 3'-UTR.



**Figura 32. Modelo teórico de la interacción entre la 5' y 3'-UTR de los mRNAs de SINV.** A) Secuencia y estructura secundaria (predicción hecha con *RNAfold*) de los extremos 5' y 3' del gmRNA y sg mRNA de SINV. Los nucleótidos involucrados potencialmente en las interacciones RNA-RNA de larga distancia predichas entre la 5' y 3'-UTR (líneas de puntos) se muestran en negrita. Los nucleótidos reemplazados para obtener los diferentes mutantes se indican en blanco dentro de círculos negros. Los codones de iniciación AUG se incluyen en recuadros. B) Diagrama esquemático del genoma de SINV wt y de las diferentes construcciones usadas en los ensayos de traducción: el replicón rep C+luc, el mRNA subgenómico C+luc y el mRNA genómico no replicativo SV-Luc ΔnsP4. Abreviaturas: sg, subgenómico; SL, *stem-loop*; UTR, región no traducida; Mut, mutante; Sec, secuencia; g, genómico; nsPs, proteínas no estructurales; sPs, proteínas estructurales; sg.P., promotor subgenómico.

Esta robusta disminución de la actividad luc en células C6/36 puede deberse a perturbaciones en diferentes etapas del ciclo de replicación del virus, incluyendo la traducción del gmRNA, la replicación/transcripción de RNA o la traducción del sg mRNA. Puesto que la traducción del gmRNA es el primer evento que sucede tras la liberación del genoma de SINV dentro de la célula, analizamos la

producción de nsPs. Como se puede observar en la figura 33, en concordancia con las medidas de actividad luc, la síntesis de nsP1 y nsP2 es muy débil en células transfectadas con rep C+luc 3'/12 y rep C+luc 3'/123, y no detectamos bandas correspondientes a estas proteínas mediante *Western blot* (Figura 33C, panel inferior). Por otra parte, las cantidades de nsPs producidas por rep C+luc control, rep C+luc 3'/1, rep C+luc 3'/2 y rep C+luc 3'/3 son muy similares (Figura 33C, panel inferior). Estos resultados indican que las secuencias repetidas mutadas en la 3'-UTR podrían ser importantes para el funcionamiento del gmRNA de SINV en células de insecto.

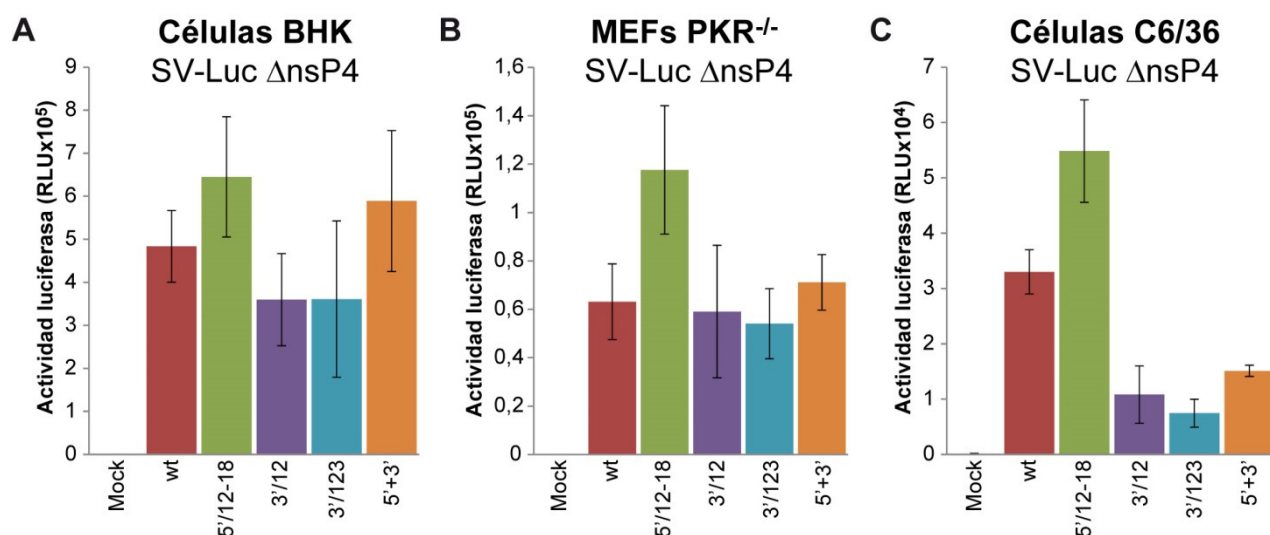


**Figura 33. Síntesis de proteínas en células transfectadas con replicones de SINV con la 3'-UTR mutada.** A-C) Replicones de SINV obtenidos mediante transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T7 fueron transfectados en células BHK (A), MEFs PKR<sup>-/-</sup> (B) o C6/36 (C) usando Lipofectamina 2000. Se recogieron las células a las 7, 8 ó 9 hpt, respectivamente, para analizar la actividad luc. Los datos son la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado (paneles superiores). En paralelo, se evaluó la acumulación de nsP1 y nsP2 mediante inmunoblot utilizando anticuerpos específicos (paneles inferiores). \* señala las bandas inespecíficas.

Para estudiar con más detalle este fenómeno, usamos la construcción SV-Luc  $\Delta$ nsP4, que contiene el gen luc dentro de la secuencia de nsP3 y es incapaz de replicar debido a la delección de la mayoría de la secuencia codificante para nsP4 (Figura 32B). Esta construcción permite el análisis directo de la traducción del gmRNA introducido por transfección midiendo actividad luc. Se diseñaron varias variantes de este gmRNA: SV-Luc  $\Delta$ nsP4, SV-Luc  $\Delta$ nsP4 3'/12 y SV-Luc  $\Delta$ nsP4 3'/123 con regiones 3'-UTR wt o mutadas, SV-Luc  $\Delta$ nsP4 5'/12-18 con la estructura SL1 de la 5'-UTR alterada, y SV-Luc  $\Delta$ nsP4 5'+3' con cambios de base compensatorios en las 5' y 3'-UTRs que restituyen la posible interacción RNA-RNA de larga distancia (Figura 32A). La síntesis de luc en células BHK transfectadas con SV-Luc  $\Delta$ nsP4 5'/12-18 es mayor que la del control SV-Luc  $\Delta$ nsP4 wt (estimulación del 33%, Figura 34A). Este resultado es consistente con datos previos que revelaron un incremento en la eficiencia traduccional tras la mutación de la estructura g SL1 [166]. Los mutantes de la 3'-UTR exhiben una ligera reducción de la actividad luc en relación al control wt (25% en SV-Luc  $\Delta$ nsP4 3'/12 y SV-Luc  $\Delta$ nsP4 3'/123), y el mutante SV-Luc  $\Delta$ nsP4 5'+3' es un poco más eficiente (121% en comparación con SV-Luc  $\Delta$ nsP4 wt). En células MEFs PKR<sup>-/-</sup> estos replicones se comportan de manera similar: los valores de actividad luc obtenidos de SV-Luc  $\Delta$ nsP4 5'/12-18, 3'/12, 3'/123 y 5'+3' son el 186%, 93%, 85% y 112%, respectivamente, con respecto a los del control SV-Luc  $\Delta$ nsP4 wt



(Figura 34B). La producción de luc de SV-Luc  $\Delta$ nsP4 5'/12-18 también aumenta, en un 66%, en relación al control en células C6/36 (Figura 34C). En cambio, las mutaciones introducidas en la 3'-UTR sí que ejercen un claro efecto inhibitor, en concordancia con los resultados previos (Figura 33C). Así, cuando se transfectan SV-Luc  $\Delta$ nsP4 3'/12, 3'/123 y 5'+3', la actividad luc se reduce en un 67%, 77% y 54%, respectivamente, con respecto a SV-Luc  $\Delta$ nsP4 wt en esta línea celular (Figura 34C).



**Figura 34. Análisis de la influencia de las UTRs en la eficiencia traduccional del gmRNA de SINV en diferentes tipos celulares.** A-C) Se transfectaron células BHK (A), MEFs PKR<sup>-/-</sup> (B) y C6/36 (C) con gmRNAs de SINV no replicativos (SV-Luc  $\Delta$ nsP4), previamente transcritos *in vitro* con la RNA polimerasa SP6, usando Lipofectamina 2000. A las 4 hpt se recogieron las células y se lisaron para la medición de luc. Los valores de actividad luc representan la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos hechos por triplicado.

Colectivamente, nuestros resultados sugieren que las secuencias repetidas presentes en la 3'-UTR del genoma de SINV podrían regular la traducción del gmRNA selectivamente en células de mosquito. Además, la interacción RNA-RNA predicha entre las secuencias de las regiones 5' y 3'-UTRs del gmRNA no parece producirse, ya que la mutación de los nucleótidos localizados en la 5'-UTR genómica no tiene efectos negativos en ninguna de las líneas celulares analizadas. Alternativamente, es posible que, además de la probable interacción RNA-RNA de larga distancia, pudieran ser necesarios otros eventos para aumentar la traducción del gmRNA de SINV.

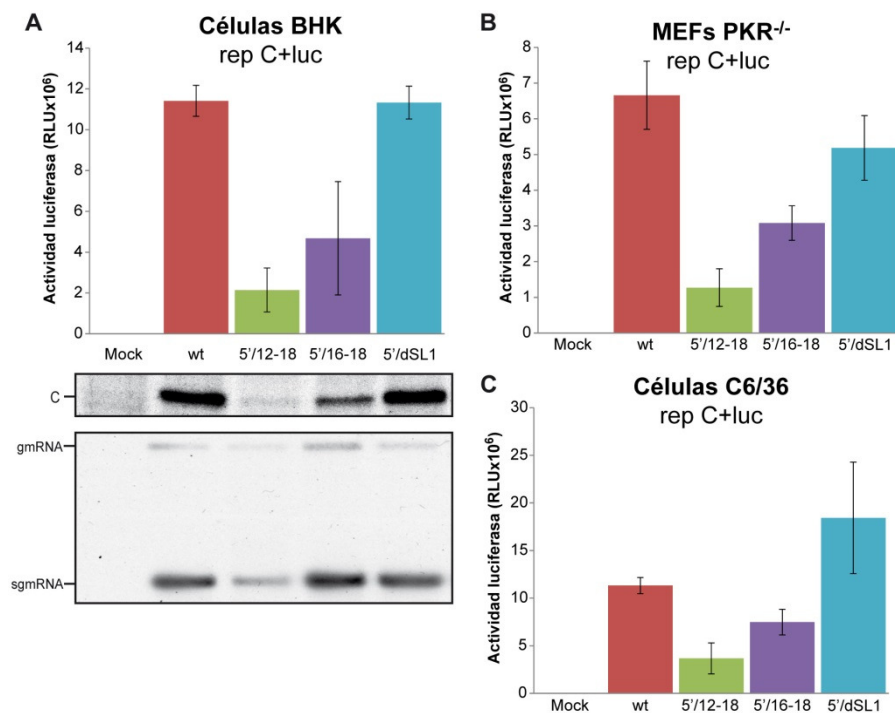
#### 4.3.2. Importancia de la L26S de SINV para la traducción en un contexto de replicación

Como se indicó previamente, existen secuencias complementarias de siete nucleótidos en las 5' y 3'-UTRs del sgRNA de SINV (Figura 32A) que podrían tener alguna función durante la infección. De hecho, las mutaciones introducidas en la región 3'-UTR de rep C+luc apenas tuvieron consecuencias negativas para su traducción en células BHK y PKR<sup>-/-</sup>, pero sí demostraron ser importantes para la traducción del gmRNA

en células de insecto. No obstante, no hemos podido demostrar la existencia de una interacción de larga distancia entre las regiones 5' y 3'-UTRs. Aun así, es todavía posible que estas secuencias sean relevantes para el funcionamiento del sgRNA. Por este motivo decidimos evaluar, en primer lugar, la importancia de la horquilla presente en la región 5'-UTR del sgRNA; para ello usamos replicones con la estructura sg SL1 mutada (Figura 32A). En la construcción rep C+luc 5'/12-18 sustituimos mediante mutagénesis dirigida los nucleótidos 12 al 18, que conforman el lazo. Los nucleótidos 1 a 5 de la 5'-UTR del sgRNA son necesarios para la actividad del promotor interno [167], pero el número exacto de nucleótidos requeridos para la actividad completa de este promotor sigue siendo desconocido, aunque se ha propuesto que los primeros 14 nucleótidos son importantes [168,169]. Por este motivo, también mutamos únicamente los nucleótidos 16 a 18 (rep C+luc 5'/16-18). La variante rep C+luc 5'/dSL1 contiene mutaciones en los nucleótidos 22 a 30 que desorganizan la horquilla sg SL1, la cual está conservada entre diferentes especies de alfavirus [170]. Estos replicones fueron probados inicialmente en células BHK, mediante transfección y medida de actividad luc o marcaje radiactivo. La traducción del sgRNA de rep C+luc 5'/12-18 está profundamente inhibida, como queda de manifiesto por la reducida actividad luc (descenso del 81% en comparación con rep C+luc wt) y el escaso marcaje metabólico de la proteína C de SINV (Figura 35A, panel superior y central, respectivamente). En el caso de rep C+luc 5'/16-18, los valores de luc disminuyen en un 59%, y la síntesis de proteína C también se reduce. En cambio, rep C+luc 5'/dSL1 es igual de eficiente que el control rep C+luc wt tanto en actividad luc como en producción de C. Sin embargo, tal y como se mencionó anteriormente, estas diferencias en la síntesis de proteínas virales pueden deberse al hecho de que el promotor interno esté afectado por las mutaciones introducidas en la L26S. Así que, en un experimento paralelo, analizamos la síntesis de RNA viral. Para ello, transfectamos células BHK con los diferentes replicones, las tratamos con actinomicina D a las 2 hpt y marcamos con [<sup>3</sup>H]-uridina de 3 a 7 hpt. Extraímos entonces el RNA total y lo separamos en geles de agarosa para distinguir los RNAs marcados. La síntesis de sgRNA es mucho menor para el replicón rep C+luc 5'/12-18 que para rep C+luc wt, mientras que se mantiene para rep C+luc 5'/16-18 y rep C+luc 5'/dSL1 (Figura 35A, panel inferior). Por tanto, los nucleótidos 16 a 18 podrían contribuir a la traducción del sgRNA de SINV sin afectar la eficiencia del promotor interno, mientras que la estructura en sí misma de la horquilla sg SL1 podría no ser importante para el funcionamiento de este mRNA.

También se mide la actividad luc en células PKR<sup>-/-</sup> y C6/36 transfectadas con los diferentes replicones. Los resultados en MEFs PKR<sup>-/-</sup> son muy similares a los obtenidos en células BHK: rep C+luc 5'/12-18 y rep C+luc 5'/16-18 dan, respectivamente, un 81% y 54% menos de actividad luc que rep C+luc, mientras que con rep C+luc 5'/dSL1 se reduce solamente en un 22% (Figura 35B). En células de mosquito se observan algunas diferencias. Las mutaciones en el lazo de la estructura sg SL1 son menos perjudiciales que en células de mamífero y la actividad luc de rep C+luc 5'/12-18 y rep C+luc 5'/16-18 disminuye en un 68% y 34%, respectivamente. La alteración del tallo de sg SL1 (rep C+luc 5'/dSL1) induce una estimulación en la producción de luc del 63% en comparación con rep C+luc wt (Figura 35C).

En conjunto, estos datos indican que los nucleótidos 12-18 de la 5'-UTR del sgmRNA son importantes para la transcripción, pero los nucleótidos 16-18, que no afectan a la síntesis de RNA, también son necesarios para la traducción eficaz de este mRNA viral.



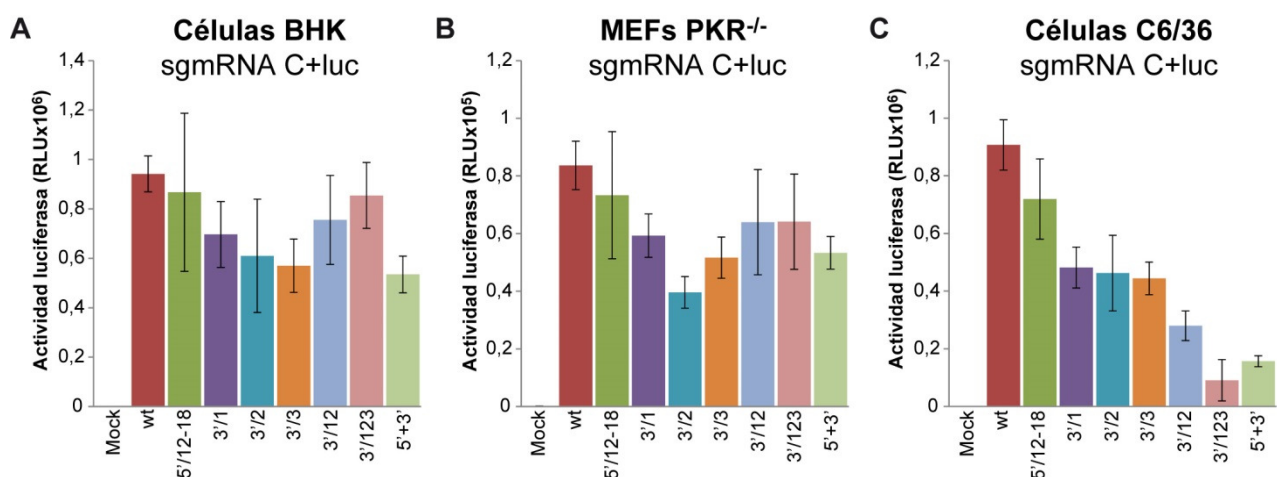
**Figura 35. Traducción y síntesis de RNA en diferentes tipos celulares tras la transfección con replicones de SINV que contienen la 5'-UTR del sgmRNA alterada.** A) Se transfectaron células BHK con replicones transcritos *in vitro*, usando Lipofectamina 2000. Se recogieron las células en buffer de lisis a las 7 hpt y se midió la actividad luc (panel superior). La síntesis de proteína C fue analizada mediante el marcaje radiactivo con [<sup>35</sup>S]Met-Cis de 6 a 7 hpt, seguido de la separación por SDS-PAGE y autorradiografía (panel central). Los RNAs virales se detectaron por incorporación de [<sup>3</sup>H]-uridina de 3 a 7 hpt y separación en gel de agarosa, como se describe en *Materiales y métodos* (panel inferior). B, C) MEFs PKR<sup>-/-</sup> (B) y células C6/36 (C) fueron transfectadas como en (A). La actividad luc se determinó a las 6 y 8 hpt, respectivamente. Los valores de actividad luc representan la media ± D.E. de tres experimentos realizados por triplicado.

#### 4.3.3. Traducción de sgmRNAs de SINV con 5' y/o 3'-UTRs mutadas fuera de un contexto de replicación

A continuación pretendíamos examinar, directamente, la traducción de los sgmRNAs reporteros en ausencia de replicación viral. Para conseguirlo, construimos varias variantes del plásmido pT7 C+luc (ver descripción en la Tabla S4). Mediante transcripción *in vitro* obtuvimos los sgmRNAs correspondientes (ver Figura 32B) y, al igual que antes, los transfectamos en diferentes líneas celulares para medir la actividad luc. Al contrario de lo que se observa con los replicones rep C+luc 5'/12-18 y rep C+luc 5'/16-18 (Figura 35), los valores de actividad luc obtenidos en células BHK transfectadas con el sgmRNA C+luc 5'/12-18 son similares al sgmRNA C+luc wt (Figura 36A). Este resultado apunta a que la L26S puede ser importante para la traducción del sgmRNA únicamente en el contexto de replicación viral. Las mutaciones individuales de las secuencias repetidas localizadas en la 3'-UTR provocan una inhibición parcial de la síntesis de luc: 26%, 35% y 39% para los sgmRNAs C+luc 3'/1, 3'/2 y 3'/3, respectivamente (Figura 36A). Los sgmRNAs con 3'-UTRs con mutaciones dobles o triples (sgmRNA C+luc 3'/12 y 3'/123) son solamente un 20% y 9% menos eficientes que el sgmRNA C+luc wt. La actividad luc producida por el sgmRNA C+luc 5'+3', con mutaciones compensatorias en las 5' y 3'-UTRs, se ve disminuida en un 43% en comparación con la transfección control. También estudiamos la traducción en MEFs PKR<sup>-/-</sup>. En coherencia con los resultados



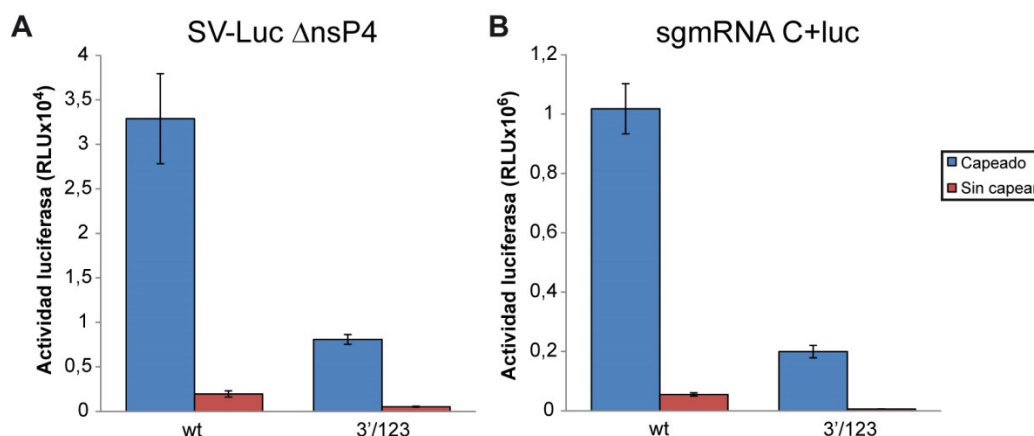
obtenidos en células BHK, el sgRNA C+luc 5'/12-18 se traduce en la misma medida que el control en MEFs PKR<sup>-/-</sup> (Figura 36B). Los sgRNAs C+luc 3'/1, 3'/2 y 3'/3 muestran una reducción del 29%, 52% y 38% en la producción de luc, respectivamente. Hay poca inhibición de la síntesis de proteínas virales en células transfectadas con los sgRNAs C+luc 3'/12 y 3'/123. Además, la síntesis de luc descende en un 36% en MEFs PKR<sup>-/-</sup> que traducen el sgRNA con las 5' y 3'-UTRs mutadas simultáneamente en relación al control (sgRNA C+luc 5'+3', Figura 36B). En células de mosquito C6/36, la traducción del sgRNA C+luc 5'/12-18 transfectado se ve poco afectada por las modificaciones introducidas en la L26S (reducción del 21%, Figura 36C). Sin embargo, los cambios en la 3'-UTR sí tienen efectos inhibitorios. Por consiguiente, los valores de luc obtenidos a partir de los sgRNAs C+luc 3'/1, 3'/2 y 3'/3 son un 46-51% menores que en el sgRNA C+luc wt. En el caso del sgRNA C+luc 3'/12, la producción de luc se reduce en un 69%, mientras que el sgRNA C+luc 3'/123 se bloquea igual que su replicón correspondiente (90%). La síntesis de luc dirigida por el sgRNA C+luc 5'+3' también se ve limitada (83% de inhibición). De este modo, parece ser que la traducción del sgRNA de SINV en células de insecto fuera del contexto de replicación dependería de secuencias localizadas en la 3'-UTR, como ocurre con el gmRNA.



**Figura 36. Efecto de mutaciones en las UTRs sobre la producción de luc dirigida por sgRNAs de SINV, sintetizados *in vitro* y transfectados en células.** A-C) Se transfectaron células BHK (A), MEFs PKR<sup>-/-</sup> (B) y C6/36 (C) con sgRNAs de SINV transcritos *in vitro* (con la RNA polimerasa T7), usando Lipofectamina 2000. Se recolectaron las células en buffer de lisis a las 4 hpt y se determinó la actividad luc. Los valores de actividad luc obtenidos a partir de los diferentes sgRNAs se presentan como la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes hechos por triplicado.

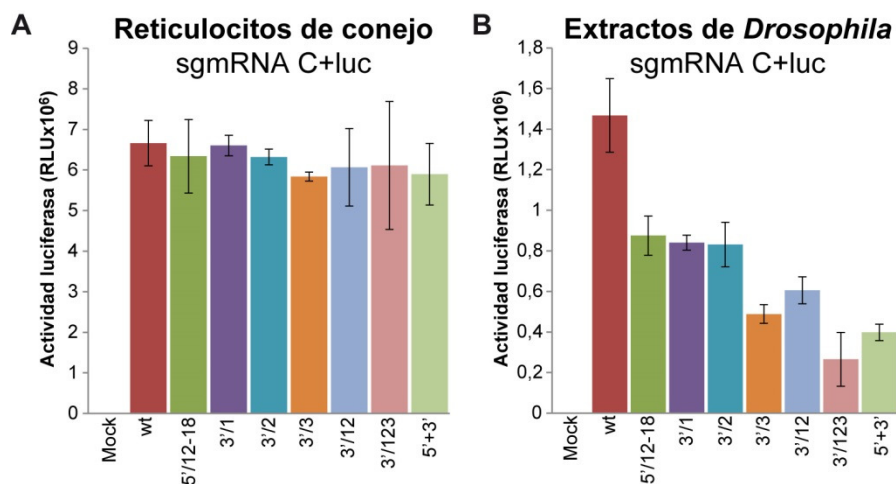
Puesto que existe una similitud estructural considerable entre el motivo de la 3'-UTR de SINV compuesto por las tres regiones repetidas y algunos elementos presentes en virus de plantas descritos como CITEs [87], quisimos investigar hasta qué punto el motivo de SINV se comporta de una manera similar a la descrita para un CITE. Así, examinamos en células de mosquito la traducción de mRNAs virales (gmRNA y sgRNA) capeados y no capeados, y con o sin mutaciones en la zona 3'-UTR. Con este fin, sintetizamos *in vitro* los diferentes mRNAs añadiendo o no el análogo de cap a las mezclas de transcripción. Después transfectamos los mRNAs en células de insecto y determinamos la actividad luc. La síntesis de luc dirigida

por el gmRNA y sgmRNA sin capear disminuye severamente en células C6/36, y esta inhibición es aún mayor cuando las tres secuencias de la 3'-UTR se encuentran mutadas (Figura 37). Por tanto, el motivo presente en la 3'-UTR de los mRNAs de SINV no imita a los CITEs de virus de plantas, que generalmente confieren independencia de cap para la traducción.



**Figura 37. Traducción del gmRNA y sgmRNA de SINV, capeados y no capeados, en células de insecto.** A, B) Las versiones *wild type* o mutante 3'/123 de SV-Luc ΔnsP4 y sgmRNA C+luc fueron sintetizadas mediante transcripción *in vitro* en reacciones que contenían o no el análogo de cap m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G. Seguidamente, los gmRNAs (A) o sgmRNAs (B) correspondientes fueron transfectados en células de mosquito C6/36 usando Lipofectamina 2000. A las 4 hpt, se recogieron las células y se lisaron para medir la actividad luc. Los resultados se representan como la media ± D.E. de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

La posible participación de las UTRs en la traducción del sgmRNA de SINV también se estudió en otro contexto: sistemas libres de células. Usamos, en primer lugar, RRL programados con los diferentes sgmRNAs preparados previamente *in vitro*, y medimos actividad luc. Como se muestra en la Figura 38A, todas las variantes del sgmRNA C+luc producen cantidades similares de luc independientemente de si la 5'-UTR, la 3'-UTR o ambas han sido mutadas. Examinamos también la traducción *in vitro* de estos mRNAs en un sistema libre de células obtenido a partir de extractos de *Drosophila melanogaster* [133], encontrando varias diferencias con respecto a los RRL. La mutagénesis dirigida de los nucleótidos 12-18 en la sg 5'-UTR resulta en una reducción de la actividad luc del sgmRNA de un 40% aproximadamente (Figura 38B). La síntesis de luc dirigida por los sgmRNAs C+luc 3'/1, 3'/2 y 3'/3 disminuye en un 43%, 43% y 66%, respectivamente, en relación al sgmRNA C+luc wt. En concordancia con los datos previos, los sgmRNAs C+luc 3'/12 y 3'/123 se inhiben en un 59% y 82% con respecto al control. Finalmente, la actividad luc obtenida con el sgmRNA C+luc 5'+3' también se reduce potentemente, un 73% (Figura 38B). En conjunto, los resultados obtenidos en contextos de no replicación apoyan el concepto de que el sgmRNA de SINV requeriría una 3'-UTR intacta para traducirse eficazmente en sistemas de insecto.



**Figura 38. Traducción de los sgRNAs de SINV en sistemas de mamífero e insecto libres de células.** A, B) Se prepararon *in vitro* los diferentes sgRNAs de SINV usando la RNA polimerasa T7. Estos mRNAs se añadieron a RRL (A) o a extractos de *Drosophila* (B) y se incubaron durante 90 minutos a 30°C ó 25°C, respectivamente. Se midió la actividad luc y se representaron los resultados como la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes hechos por triplicado.



## DISCUSIÓN

---



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. REQUERIMIENTO DE eIFs DURANTE LA TRADUCCIÓN DEL sgRNA DE SIN V EN LÍNEAS CELULARES DE VERTEBRADO E INVERTEBRADO

Los mRNAs virales tienen que ser traducidos por la maquinaria celular de síntesis de proteínas, por lo que deben competir con un amplio repertorio de mRNAs celulares [120,153]. Normalmente, en el caso de los mRNAs virales tempranos, la síntesis de las proteínas del virus a niveles bajos es suficiente para su participación en la replicación viral. Sin embargo, a tiempos tardíos de la infección, cuando se sintetizan las proteínas estructurales, los mRNAs virales necesitan usurpar la maquinaria de traducción celular para producir los componentes del virión en grandes cantidades. En este sentido, los RNAs virales tardíos han desarrollado estructuras para maximizar su traducción y competir eficientemente con los mRNAs celulares. Una estrategia consiste, por tanto, en adquirir estructuras que hacen a estos mRNAs independientes de ciertos eIFs. De este modo, tras la infección del virus, uno o más eIFs que son necesarios para la traducción de mRNAs celulares son inactivados, lo que conlleva la inhibición de la síntesis de proteínas celulares mientras que la traducción de los mRNAs virales prevalece. Por ejemplo, en células de mamífero infectadas por SIN V, el eIF2 $\alpha$  se fosforila, pero la iniciación en los sgRNAs continúa mediante un mecanismo no del todo aclarado hasta la fecha. Trabajos previos del laboratorio y los realizados en este apartado han demostrado que, tras su entrada en la célula, el gmRNA de SIN V se traduce inmediatamente usando el eIF4A y otros eIFs canónicos [20]. En cambio, el eIF4A no participa en la traducción del sgRNA a tiempos tardíos de la infección, y probablemente no se requiera ninguno de los factores que conforman el complejo eIF4F [12,20]. También existen evidencias sobre el bajo requerimiento del eIF4E para la traducción del sgRNA de SIN V y de otros alfavirus [114,149]. Aun así, el análisis que hemos intentado realizar nosotros sobre la importancia del eIF4E en la iniciación de la traducción de este mRNA viral no ha sido del todo concluyente, debido principalmente a los efectos no controlados que provoca el inhibidor 4EGI-1 sobre otros factores que afectan de alguna manera a la traducción. Por otra parte, teniendo en cuenta que PABP, al igual que el eIF4A y el eIF4E, no se localizan en las regiones subcelulares donde se lleva a cabo la traducción viral, pudiera ser que SIN V no utilice ninguno de los eIFs canónicos, excepto el eIF3 y el eIF1, para la síntesis de proteínas a tiempos tardíos de la infección. Estas observaciones son muy sorprendentes ya que el sgRNA de SIN V contiene una estructura cap, una cola de poli(A) y una 5'-UTR casi desprovista de estructura secundaria. De hecho, únicamente el sgRNA de SIN V con una región 5'-UTR genuina manifiesta esta independencia para ciertos eIFs en un contexto de replicación. Resulta interesante que este mismo mRNA sea traducido mediante un mecanismo canónico que requiere el eIF4A, además del eIF2 y del eIF4G [12], cuando es transfectado en células de mamífero. Este mecanismo dual de iniciación de la traducción con diferente requerimiento de eIFs según las circunstancias explicaría la capacidad del sgRNA de SIN V para ser traducido en los diferentes contextos celulares impuestos por su ciclo biológico

(invertebrado-vertebrado), en los cuales la disponibilidad de eIFs varía. En conclusión, la capacidad del sgRNA de SINV para iniciar la traducción mediante distintos mecanismos facilitaría la replicación viral en diferentes huéspedes.

Es todavía difícil de concebir el mecanismo exacto por el cual se traduce el sgRNA de SINV sin algunos eIFs en un contexto de infección. En el caso del eIF2, quizás este factor sea sustituido por el eIF2A [21] o por Ligatina [13], identificada posteriormente como eIF2D [14]. Igualmente, en el caso del virus de la hepatitis C, se ha publicado que el factor eIF2 se sustituye por el eIF2A para la traducción del RNA viral después de la infección [10]. Sin embargo, el modo de acción de la estructura DLP sigue siendo bastante desconocido. Así, el sgRNA de SINV que contiene esta horquilla no requiere el eIF2 activo para traducirse en células de mamífero infectadas, mientras que este factor sí se necesita en células transfectadas o en sistemas de traducción *in vitro*, a pesar de que en ambos casos la estructura del sgRNA es la misma. Por lo tanto, la estructura DLP *per se* no confiere independencia del eIF2 al sgRNA de SINV en cualquier circunstancia, sino que ésta depende del contexto de su traducción. Se ha sugerido que este elemento sirve para ralentizar el paso de los ribosomas por esta región y detener los ribosomas justo sobre el codón de iniciación, dándoles la oportunidad de iniciar la traducción a bajas concentraciones de eIFs [106,111]. Pero esta posibilidad no explica el comportamiento dual mostrado por el sgRNA de SINV [12]. Nosotros creemos que la estructura DLP podría tener un papel activo en la iniciación de la traducción, que sería diferente del modelo que ha sido propuesto [106,111]. Curiosamente, nuestros resultados muestran diferencias entre MEFs PKR<sup>-/-</sup> y células C6/36 en la traducción del sgRNA de SINV. Ambas líneas celulares carecen de PKR y, como consecuencia, la replicación del virus no puede estimular la fosforilación del eIF2 $\alpha$ . No obstante, tras la inducción de la fosforilación del eIF2 $\alpha$  por otra vía distinta de PKR mediante el tratamiento con Tg o Ars, la traducción del sgRNA de SINV se suprime siempre en células de mosquito C6/36, y en MEFs PKR<sup>-/-</sup> únicamente cuando la horquilla DLP está desorganizada. Por el contrario, el tratamiento con hipp no inhibe la traducción viral en ninguna de estas dos líneas. Estos resultados sugieren una acción conjunta de la estructura DLP con otros elementos específicos que están presentes en células de mamíferos para reemplazar exclusivamente el papel del eIF2. Estos componentes, todavía sin definir, podrían estar ausentes o ser ineficientes en células de mosquito. Notablemente, el tratamiento con Tg no reduce la síntesis de proteínas virales en MEFs PKR<sup>-/-</sup> infectadas con SINV wt (ver Figura 11B), lo que sugiere que en la fase tardía de la infección, el sgRNA podría iniciar la traducción de un modo independiente del eIF2 incluso cuando este factor se encuentra disponible en un estado sin fosforilar, al contrario que el sgRNA  $\Delta$ DLP que sí requiere el eIF2. Es decir, en células de mamífero infectadas con SINV, la horquilla DLP parece propiciar de alguna manera la traducción del sgRNA sin el eIF2. Como se ha mencionado, los factores de iniciación eIF2A y eIF2D han sido propuestos como sustitutos del eIF2 en la traducción del sgRNA de SINV. No obstante, su relación con la estructura DLP en células de mamífero infectadas requiere una investigación más profunda. Finalmente, esta estructura no es la responsable de conferir independencia del eIF4A para la traducción del sgRNA de SINV, y muy probablemente no proporciona independencia para ningún otro eIF aparte del eIF2.



La infección por alfavirus provoca una caída drástica de la síntesis de proteínas celulares en líneas de mamífero. Se han postulado varias hipótesis para explicar este fenómeno. Una de ellas apuesta por que la modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática por una o varias proteínas virales provoca un incremento de las concentraciones iónicas en el citoplasma que induce la traducción preferente de los mRNAs virales [101,102], en línea con lo que se sugirió anteriormente para picornavirus [171,172]. Otra hipótesis afirma que la proteína C de alfavirus interacciona con los ribosomas, promoviendo la inhibición selectiva de la traducción celular pero no la del sgRNA viral [173]. Sin embargo, ciertos replicones de SINV desprovistos de la región codificante para las proteínas estructurales, y por tanto de C, inhiben la traducción celular con una cinética y eficacia similar a la de los replicones no defectivos [106]. Además, la cantidad de sgRNA producido a partir del replicón sin proteínas estructurales es baja, lo que sugiere que la sobreproducción del sgRNA y su competencia con los mRNAs celulares tampoco es la causa de la inhibición de la traducción celular. Estas observaciones apuntan a que las nsPs de SINV y/o la replicación del RNA viral son los responsables del *shut-off* de la síntesis de proteínas del huésped. La inactivación de un eIF, como el eIF2, tras la infección por alfavirus también podría contribuir al fenómeno del *shut-off*. La fosforilación del eIF2 bloquearía específicamente la traducción celular, ya que la síntesis de proteínas dirigida por el sgRNA no requiere el eIF2 activo [12,21,100]. Sin embargo, también se ha observado un bloqueo de la traducción celular en MEFs PKR<sup>-/-</sup> infectadas por alfavirus a pesar de que en esta línea el eIF2 permanece sin fosforilar [21,99]. Por ello se postuló la existencia de varias vías redundantes de inhibición: un mecanismo conocido mediado por PKR y la fosforilación del eIF2, y otro/s desconocido/s e independiente/s de PKR [100]. Nuestros últimos datos indican que existe una relación entre una elevada replicación viral, la salida de proteínas nucleares al citoplasma y el *shut-off* de la traducción celular [107]. Mutantes con baja capacidad replicativa no inducen eficientemente este fenómeno, en concordancia con otros trabajos [104,174]; además, ciertos compuestos que inhiben la replicación también previenen el *shut-off* de la traducción celular. En esta dirección hay que indicar que en células de mosquito infectadas, la tasa de replicación viral es baja y tampoco se induce eficientemente el *shut-off*. Por este motivo, el análisis de la síntesis de proteínas celulares en líneas de insecto puede dar nuevas pistas para entender mejor la supresión de la traducción celular. Existen varias diferencias entre células de mamífero y de mosquito, como por ejemplo la temperatura de incubación y el medio de cultivo empleado. Nosotros hemos analizado la síntesis de proteínas a 37°C en un incubador con suministro de CO<sub>2</sub> y hemos comprobado que, bajo estas condiciones, tampoco se inhibe la traducción de la célula huésped de mosquito tras la infección con SINV (resultados no publicados). Cabe destacar que después de varias décadas de investigación sobre el fenómeno del *shut-off* en células infectadas por alfavirus, todavía no entendemos el mecanismo molecular exacto.

Por lo que respecta a la implicación de la estructura DLP en la iniciación de la traducción del sgRNA sin el eIF2, un dato interesante es que, en células de insecto, la infección de SINV no estimula la fosforilación del eIF2 $\alpha$ , tal y como se muestra en este trabajo y en la bibliografía [113]. Además, el tratamiento con Ars, un compuesto que induce la fosforilación del eIF2 $\alpha$ , bloquea la traducción del sgRNA de SINV en estas células. Este resultado fue totalmente inesperado y sugiere que la horquilla DLP no

confiere independencia del eIF2 por sí mismo. En conclusión, en células de insecto infectadas con SINV se necesita el eIF2 para la traducción del sgmRNA y este factor no puede ser reemplazado por otro componente celular o viral; además, la estructura DLP no es funcional en estas células. Sin embargo, en estas células de invertebrado, el eIF4A sí es prescindible para la traducción del sgmRNA. Muy probablemente, el complejo eIF4F no está implicado en la iniciación de la traducción de este mRNA viral en esta línea celular, al igual que ocurre en células de mamífero [20]. El proceso de iniciación del sgmRNA, que contiene la estructura cap, sin la participación del complejo eIF4F, es de especial interés. Quizás, este complejo sea sustituido por una proteína viral, como se ha descrito que hace la proteína N de hantavirus [117]. Por otra parte, la función del eIF2 puede ser sustituida en células de mamífero, pero no en células de mosquito, lo que indicaría que uno o más componentes específicos de células de vertebrado, junto con la estructura DLP, llevan a cabo esta labor. Aun así, sería necesario investigar con más detalle el modo exacto por el que el sgmRNA de SINV inicia la traducción, con el objetivo de entender mejor cómo un mRNA capeado, con una 5'-UTR corta casi desprovista de estructura secundaria, es traducido sin la participación de varios eIFs.

## 5.2. ESTUDIO DEL MECANISMO DE SELECCIÓN DEL CODÓN DE INICIACIÓN EN EL sgmRNA DE SINV

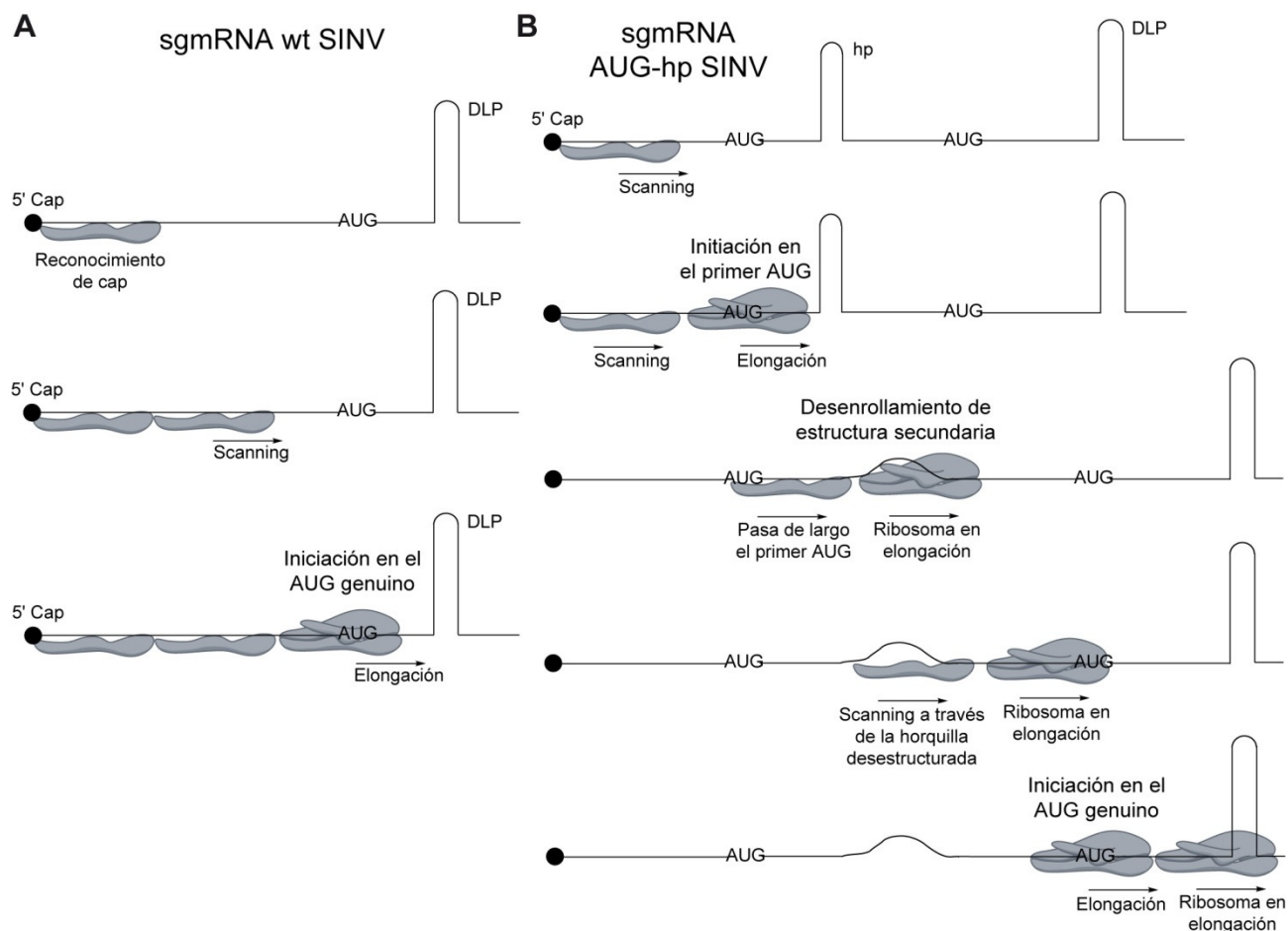
La selección incorrecta del codón de iniciación conlleva la síntesis de proteínas o péptidos aberrantes que pueden ser tóxicos para las células. Por tanto, la maquinaria de síntesis de proteínas ha evolucionado en un sofisticado sistema para seleccionar adecuadamente el codón de iniciación en los mRNAs [63,175]. En los alfavirus no se conocía el mecanismo de selección del codón AUG en el sgmRNA. Existen estudios en sistemas *in vitro* reconstituidos con componentes purificados de la maquinaria de traducción que han servido para determinar que el eIF3 y DHX29 pueden promover la formación de complejos de iniciación 48S en el sgmRNA de SINV [13]. En esos ensayos, en ausencia del eIF2, el eIF2D pudo reclutar el Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> al sitio P del ribosoma. Los resultados obtenidos con este sistema *in vitro* fueron consistentes con la colocación de codón de iniciación AUG directamente en el sitio P, sin *scanning* de la región 5'-UTR del sgmRNA de SINV [13]. Sin embargo, este mRNA viral exhibe un mecanismo de traducción dual dependiendo de si se examina en sistemas libres de células, en células transfectadas o en células infectadas por el virus [12]. Nuestras evidencias sugieren que el mecanismo de iniciación en el sgmRNA implica un *scanning* de la región 5'-UTR, y no opera una iniciación interna. Estos datos cuestionan la extrapolación de los resultados obtenidos con sistemas *in vitro* a lo que ocurre en las células infectadas por el virus. Existen varias posibilidades para explicar las diferencias halladas entre los datos descritos por Skabkin et al. (2010) y los nuestros. Una de ellas sería el empleo de sistemas diferentes, de manera que los sistemas *in vitro* podrían contener, por ejemplo, concentraciones iónicas que influyeran en la interacción de los ribosomas 80S con el sgmRNA de SINV. Además, es probable que la estructura DLP presente en el sgmRNA de SINV promueva esta interacción. Alternativamente, podría ser que la inserción de una horquilla dentro de la L26S, como la que se ha descrito en este apartado, afecte la posible interacción directa de los ribosomas 80S con el codón de iniciación genuino. Sin embargo, esta opción no concuerda con que el gmRNA de SINV no dirija la traducción desde el segundo cistron, mientras que cuando se sustituye la 5'-UTR del sgmRNA por diferentes IRES virales, sí se observa una iniciación de la traducción interna en los gmRNAs [23]. Además, un replicón de SINV modificado para producir un sgmRNA recombinante bicistónico, con una duplicación de la L26S genuina, es incapaz de traducir el gen de la proteína C, que estaría controlado por la segunda secuencia líder interna [23]. Estos datos apoyan la idea, en definitiva, de que la L26S de SINV sin modificar no promueve una iniciación interna. Otra observación importante en favor del mecanismo de *scanning* para traducir el sgmRNA es que la inserción de un AUG delante de la secuencia CAA<sub>14</sub> en el sgmRNA CAA<sub>14</sub> disminuye la utilización del AUG genuino en el sgmRNA AUG-CAA<sub>14</sub>, lo que indica que un porcentaje de los complejos de preiniciación comienzan la traducción desde el primer AUG. Este resultado se observó en tres líneas celulares diferentes y en RRL. Cabría esperar que, si existiera una iniciación interna en el AUG genuino del sgmRNA de SINV, la presencia de un codón de iniciación previo no afectaría la producción de la proteína C genuina.

Ciertas características estructurales y algunas particularidades de la secuencia de nucleótidos influyen en la selección del AUG por el complejo de preiniciación [62]. Una de estas características es la secuencia de nucleótidos que flanquea al AUGi; así, una purina presente en la posición -3 y una G en la posición +4 constituyen un contexto óptimo. En este sentido, el sgmRNA de SINV no satisface totalmente este requisito puesto que hay un residuo de adenina en la posición +4. Además, otro factor importante para la selección del AUG es la distancia desde la estructura cap hasta el codón de iniciación [62,63]. En el caso del sgmRNA de SINV, esta distancia es de 49 nucleótidos, que está dentro de la longitud normal de las secuencias líderes de los mRNAs de vertebrados [176]. Cuando esta L26S se expande a 91 nucleótidos, pero sin introducir estructuras secundarias, el sgmRNA resultante (sgmRNA CAA<sub>14</sub> SINV) dirige la traducción eficientemente tanto en células de vertebrado como de mosquito. En cambio, la presencia de una estructura en forma de horquilla, situada entre la estructura cap y el codón AUG, suprime significativamente la traducción (sgmRNA hp SINV y sgmRNA hp30 SINV). La colocación de un AUG en un buen contexto de secuencia antes de esta horquilla (sgmRNA AUG-hp SINV) recupera parcialmente la capacidad de traducción. Un dato muy interesante es que este mRNA puede ahora iniciar la traducción en cualquiera de los dos codones AUG, y cada uno es elegido preferentemente dependiendo del tipo celular o del grado de fosforilación del eIF2 $\alpha$ . Curiosamente, la presencia de esta estructura *hp* promueve la iniciación en el AUG que la precede en células MEFs PKR<sup>-/-</sup> (donde la replicación viral no induce la fosforilación del eIF2 $\alpha$ ) pero no en células BHK. En un estudio previo utilizando BHKs, van Duijn y sus colaboradores expresaron sgmRNAs mutantes de SFV conteniendo dos codones AUG en fase [177]. Se dieron cuenta de que la traducción empezó principalmente desde el nuevo codón AUG insertado. No obstante, las construcciones empleadas en esos experimentos carecían de las proteínas replicativas virales, por lo que se trataría de un contexto no replicativo en el que el eIF2 $\alpha$  presumiblemente permanecía sin fosforilar. Nosotros hemos analizado en células BHK con replicones de SINV (en las que se ha descrito ampliamente que el eIF2 está fosforilado) la producción de la proteína C a partir de dos construcciones que contienen dos codones de iniciación (rep C+luc AUG-hp y rep C+luc AUG-CAA<sub>14</sub>), y nuestros resultados demuestran que la mayoría de la síntesis de C comienza desde el codón AUG auténtico. Esto sugiere que el contexto celular y el estado de fosforilación del eIF2 $\alpha$  determinan la selección del AUG.

Por otro lado, el mecanismo exacto de traducción de los sgmRNAs de SINV que contienen dos codones de iniciación sigue siendo un poco confuso, particularmente cuando hay presente una horquilla entre ambos AUGs, como ocurre en el sgmRNA AUG-hp SINV. La posibilidad de que se produzca un salto (*shunting*) de los ribosomas durante el proceso de iniciación de la traducción del sgmRNA de alfavirus no está apoyada por el hecho de que las construcciones rep C+luc hp y rep C+luc hp30, que contienen una horquilla situada en medio de la L26S antes del codón de iniciación genuino, no son funcionales. Es más, estos resultados tampoco respaldan una iniciación directa desde el codón de iniciación. Podría ser todavía formalmente posible que en los sgmRNAs con dos AUGs, una proporción de los complejos de iniciación 80S formados en el primer AUG salten hasta el segundo AUG; sin embargo, creemos que este mecanismo no está sucediendo porque una construcción con dos codones de terminación antes del AUG genuino, ubicados

9 nucleótidos después de la horquilla (rep C+luc STOP), no es operativa. La inhibición de la síntesis de luc o C es incluso mayor en la construcción rep C+luc hpSTOPhp2, que incluye una horquilla extra entre los codones de parada y el AUG genuino. Estos resultados no apoyan que el proceso de *shunting* ribosomal esté ocurriendo durante la traducción de este mRNA. De este modo, los complejos de preiniciación o incluso los ribosomas 80S, cuando están unidos a la estructura cap o al primer AUG, no serían capaces de saltar o ensamblarse directamente en el segundo codón de iniciación sin un *scanning* previo. En su lugar, un modelo más probable se representa en la Figura 39, en el que los ribosomas 80S que inician la traducción desde el primer AUG serían capaces de pasar a través de la horquilla, aplanándola y permitiendo el avance de los complejos de preiniciación 43S que preceden al ribosoma 80S y que pasarían de largo el primer AUG (*leaky scanning*). Estos complejos de preiniciación 43S atravesarían la L26S detrás de los ribosomas 80S que ya están en la fase de elongación hasta que alcanzan el segundo AUG. Por tanto, la iniciación en ambos AUGs se puede explicar mediante este modelo incluso si existe una horquilla entre ellos. Según este modelo, la supresión total de la traducción desde el primer AUG bloquearía también la iniciación desde el AUG genuino. No obstante, una inhibición parcial en el primer AUG permitiría que unos pocos ribosomas 80S pudieran aplanar la horquilla, y el paso continuo de los complejos de preiniciación 43S mantendría esta estructura desorganizada, dirigiendo la traducción al segundo AUG. La paradoja de este modelo estaría en que la reducción de la iniciación desde el primer AUG tras la fosforilación parcial del eIF2 $\alpha$  todavía permite la utilización del codón posterior. Pero esta paradoja puede resolverse si una baja frecuencia de eventos de iniciación en el primer AUG fuera suficiente para desenrollar la horquilla, permitiendo el paso de los complejos de preiniciación hasta que encuentran el codón de iniciación genuino.

Un aspecto importante de nuestro trabajo surge de la generación de mRNAs que contienen dos codones de iniciación funcionales: el primero de ellos siempre requiere el eIF2 activo mientras que el segundo, que es el AUG auténtico, es capaz de iniciar la traducción sin el eIF2. Se podría plantear la hipótesis de que en células infectadas por SINV, una reducida proporción del eIF2 permanece sin fosforilar en los focos donde se lleva a cabo la traducción viral, y esta pequeña porción del eIF2 activo transferiría el Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> al ribosoma. Sin embargo, el análisis de la traducción en mRNAs que contienen dos codones de iniciación en células que replican SINV contradice tal posibilidad. Así, se puede observar con esos mRNAs que la fosforilación del eIF2 $\alpha$  bloquea la iniciación desde el primer AUG, mientras que el segundo, que está cerca de la horquilla DLP, se ve muy poco afectado. Por consiguiente, si el eIF2 permaneciera sin fosforilar o si fuera desfosforilado por una proteína viral precisamente en estos focos de traducción, ambos AUGs serían usados para la iniciación. El hecho de que, en un contexto de infección en MEFs PKR<sup>-/-</sup>, el primero sea inhibido por Tg pero el segundo no, reafirma aún más el concepto de que el elemento DLP localizado 24 nucleótidos después de este codón de iniciación proporciona independencia del eIF2, como se ha descrito previamente en la literatura [21,99].



**Figura 39. Modelo para la iniciación de la traducción en sgmRNAs de SINV.** A) Modelo del mecanismo de *scanning* seguido por el sgmRNA wt de SINV para iniciar la traducción. La subunidad 40S del ribosoma se fija inicialmente a la estructura cap 5' del mRNA. A continuación, la 5'-UTR es escaneada base por base en dirección 5'→3' hasta que se reconoce el codón de iniciación. B) Modelo para la iniciación de la traducción en sgmRNAs de SINV con dos codones de iniciación alternativos y una horquilla. Inicialmente, el complejo de preiniciación conteniendo la subunidad 40S del ribosoma interacciona con la estructura cap y escanea la L26S hasta encontrar el primer AUG. Después se puede formar ya el complejo de iniciación 80S y comienza la elongación, que conlleva la desestructuración de la horquilla (*hp*). Otro complejo de preiniciación empieza un *scanning* desde la estructura cap y se salta el primer codón AUG de iniciación. Este complejo de preiniciación portando la subunidad 40S del ribosoma puede pasar a través de la horquilla aplanada, viajando detrás de los ribosomas 80S en elongación. Una vez que esta subunidad 40S del ribosoma alcanza el segundo AUG, da comienzo la síntesis de proteína C auténtica a partir de este codón AUGi.

Se ha especulado que la estructura DLP confiere independencia del eIF2 para la traducción del sgmRNA debido a un impedimento parcial de los ribosomas 80S para atravesar esta horquilla [106,111]. Según esta hipótesis, los complejos de preiniciación se detendrían sobre el AUGi durante un tiempo suficiente como para permitirles comenzar la traducción en presencia de una baja concentración del eIF2. Nuestras observaciones no apoyan tal hipótesis. Así, en la construcción rep C+luc LhpL, el sgmRNA contiene la L26S genuina y una horquilla diferente (*hp*) colocada a casi la misma distancia (23 nucleótidos) que la estructura DLP, pero la horquilla *hp* no confiere independencia del eIF2. Además, se observa una situación similar con la construcción rep C+luc AUG-hp, que incluye un codón AUG en un buen contexto de secuencia y una horquilla situada 14 nucleótidos después, que en principio es la distancia óptima para parar los complejos de iniciación sobre el codón AUGi [62,66]. Este sgmRNA (sgmRNA AUG-hp SINV) requiere

el eIF2 activo para empezar la traducción desde el primer AUG. Por tanto, el modelo mecánico que sugiere que la horquilla ralentiza la progresión de los ribosomas y permite la iniciación a bajas concentraciones del eIF2 no se confirma con nuestros presentes resultados. Una hipótesis para explicar el funcionamiento de la horquilla DLP sería que esta estructura interacciona directamente con el sitio P del ribosoma, promoviendo la interacción del primer aminoacil-tRNA con el sitio A. No obstante, se necesita investigar más a fondo para desvelar el modo exacto de participación de la estructura DLP durante la iniciación de la traducción del sgRNA de SINV.

Por otra parte, el *scanning* de la región 5'-UTR de los mRNAs eucariotas supone la participación de varios eIFs incluyendo el eIF2 como parte del complejo ternario. Este factor, junto al tRNA iniciador, selecciona el AUG tras el apareamiento de bases codón-anticodón. Si el eIF2 no participa en la traducción del sgRNA de SINV, resulta complicado comprender cómo se selecciona el codón de iniciación en ausencia de este eIF. Una posibilidad, adelantada por algunos laboratorios, sería que el eIF2 es reemplazado por otro factor celular. En este sentido, se ha sugerido previamente que el eIF2A podría ser el sustituto en células infectadas por SINV [21] o por el virus de la hepatitis C [10]. Otra posibilidad es que el eIF2D se emplee en lugar del eIF2, como se describió en base a ensayos *in vitro* [13,14]. No obstante, aún falta por investigar en células infectadas por alfavirus el mecanismo molecular exacto usado por cualquiera de estos factores durante el *scanning* y la selección del AUGi en el sgRNA. Otro asunto importante en este campo es entender exactamente cómo ocurre el *scanning* en ausencia de la mayoría de eIFs canónicos, como por ejemplo el eIF4G [20] y el eIF4A activo, en células infectadas por el virus, ya que estos factores son necesarios para traducir el sgRNA en células transfectadas y en sistemas libres de células [12]. Futuras investigaciones sobre los eventos moleculares involucrados en la traducción de los mRNAs de alfavirus ayudarán a aclarar este importante proceso de la expresión génica viral.

### 5.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS REPETIDAS SITUADAS EN LA ZONA 3'-UTR DE LOS mRNAs DE SINV

Se ha descrito la existencia de una variedad de pseudonudos y/o estructuras repetidas en la región 3'-UTR de muchos virus de RNA. En la mayoría de los casos, estas estructuras participan en la replicación del RNA viral, ya que la 3'-UTR es el sitio donde interaccionan las RNA polimerasas virales para sintetizar la hebra complementaria de RNA [91]. El gmRNA y el sgmRNA de SINV comparten la misma 3'-UTR y cola de poli(A) y, por tanto, ambos contienen las tres estructuras repetidas en forma de tallo-lazo que han sido analizadas en este apartado del trabajo. Durante muchos años, el motivo por el que estas regiones repetidas están conservadas no solo en varios alfavirus, sino también en miembros de otras familias de virus, ha sido un enigma. Como consecuencia, su funcionamiento en la replicación viral sigue siendo prácticamente desconocido. Probablemente, el hecho de que estén situadas en la 3'-UTR ha orientado la investigación hacia la replicación del RNA viral en lugar de hacia la traducción del mRNA. Además, los resultados presentados en esta tesis sugieren que estas secuencias podrían ser necesarias para la síntesis de proteínas virales en células de insecto, pero no de mamífero, y este hecho puede haber añadido aún más dificultad al descubrimiento de su función durante el ciclo de vida del virus. En este sentido, han sido publicadas varias líneas de investigación sobre el modo de acción de la 3'-UTR de los alfavirus. En el virus Chikungunya, los elementos repetidos presentes en la 3'-UTR son importantes para la adaptación del virus a mosquitos, pero no a mamíferos [164]. De este modo, la 3'-UTR constituye una característica significativa para la evolución del virus en invertebrados, pero el papel exacto de las secuencias repetidas no ha sido analizado a nivel molecular. Resulta también curioso que los alfavirus que replican sólo en vertebrados, como el virus de la enfermedad pancreática de salmón [178], contienen una 3'-UTR corta, mientras que los que están restringidos a insectos, por ejemplo el virus Eilat [25] o el virus Aura [113,126,179], llevan una 3'-UTR más larga. Además, la delección de la mayor parte de la 3'-UTR de SINV, manteniendo los últimos 19 nucleótidos conservados necesarios para la replicación, es más perjudicial para el crecimiento del virus en células de mosquito que en células de pollo [129]. Estos datos son consistentes con la idea de que esta región puede ser importante para la replicación en células de insecto, pero la base molecular de este comportamiento no había sido investigada previamente. También, algunas mutaciones en flavivirus, como el virus del dengue, pueden impedir su replicación en células de mosquito, pero no de mamífero [180,181]. Como consecuencia, determinadas mutaciones en la secuencia de nucleótidos, pero no en la estructura, de una horquilla localizada en la zona 3'-UTR del genoma del virus del dengue afecta negativamente a la replicación viral, pero no a la traducción, selectivamente en células de mosquito [181].

Nuestros resultados apoyan la idea de que las secuencias repetidas en la 3'-UTR de SINV proporcionan traducibilidad a los mRNAs virales selectivamente en células de mosquito. Estas observaciones podrían explicar, a nivel molecular, la adquisición de estas regiones repetidas durante la evolución de los alfavirus. Se piensa que un antepasado de los alfavirus infectó inicialmente organismos marinos y no tenía un vector invertebrado para su propagación [26]. Este antepasado no requeriría estos elementos repetidos y



contendría una 3'-UTR más corta, como de hecho ocurre en el virus de la enfermedad pancreática de salmón y en el virus de la enfermedad del sueño [182]. Quizás, el alfavirus ancestral marino se adaptó para infectar huéspedes invertebrados en algún momento de la evolución. En esta línea hay evidencias recientes que sugieren que los alfavirus de salmónidos tienen potencial para replicar en células de mosquito de un modo dependiente de temperatura [183]. Por esta adaptación, el virus podría haber recombinado con otro virus presente en el vector, como un virus de plantas transmitido por insectos, tal y como se ha propuesto [184], adquiriendo elementos de la 3'-UTR que serían necesarios para la traducción. Sería interesante examinar en futuros estudios si otros alfavirus, y también otros arbovirus, contienen regiones en la 3'-UTR que pudieran estar involucrados en dotar de traducibilidad a sus mRNAs selectivamente en invertebrados. En resumen, los alfavirus parecen haber desarrollado dos elementos que parecen estar implicados en la traducción eficaz de sus mRNAs. Uno de estos elementos es la estructura DLP localizada tras el codón de iniciación del sgRNA, que proporciona traducibilidad en células que contienen PKR tras la inducción de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  por la infección viral (Ventoso et al. 2006, y nuestros resultados de los apartados 4.1. y 4.2.). Se ha propuesto que esta estructura es responsable de la adaptación del virus a ciertos huéspedes vertebrados [113]. El segundo elemento es la secuencia del lazo presente en las horquillas repetidas en la 3'-UTR, importantes para la traducción del gmRNA y sgRNA en células de mosquito (que carecen de PKR), como se ha sugerido en este apartado. Además, también hemos estudiado la horquilla SL1 formada al comienzo del sgRNA de SINV y de otros alfavirus. Nuestros resultados sugieren que esta estructura no es esencial para el funcionamiento del sgRNA, pero la secuencia de nucleótidos del lazo puede ser relevante para una eficiente síntesis y traducción de este mRNA, tanto en células de mamífero como de insecto transfectadas con replicones de SINV, de acuerdo con otras observaciones ya publicadas [105]. No obstante, el mecanismo preciso de *scanning* sin ciertos eIFs (apartados 4.1. y 4.2.) y la secuencia de nucleótidos exacta requerida para la traducción del sgRNA siguen siendo desconocidos, en parte debido a la dificultad de separar los eventos de transcripción y traducción en el contexto de replicación viral.

Por otra parte, no existe una recuperación total de la traducción en las variantes de SINV descritas en este apartado en las que se reestablece el hipotético apareamiento de bases entre las regiones 5' y 3', lo que indica que si estas secuencias estuvieran implicadas en la circularización del mRNA [161,162], este evento no bastaría para restaurar la traducción en células de mosquito. Este resultado concuerda con otras observaciones en virus de plantas en los que se han descritos interacciones RNA-RNA de larga distancia [87]. En algunos casos, la alteración de la horquilla presente en la 3'-UTR de algunos virus de plantas conlleva la inhibición de la traducción del mRNA, pero la síntesis de proteínas no es rescatada tras introducir mutaciones compensatorias en la estructura localizada en la 5'-UTR [89,92,185]. Una hipótesis plausible a tener en cuenta para nuestros resultados sería que, además de la formación de la interacción RNA-RNA en el caso de que ésta ocurra, podría ser necesario un segundo paso, por ejemplo, la unión de un componente del insecto, quizás una proteína o una molécula de RNA implicada en traducción, tal y como se ha sugerido [126,130,181,186,187]. Esta hipótesis podría explicar también otras diferencias encontradas entre células de insecto y de mamífero con respecto a la traducción del sgRNA de SINV. También es concebible que las

tres horquillas de SINV formen una superestructura que interaccione con la horquilla presente en el extremo 5', dirigiendo la circularización del gmRNA y/o sgmRNA. Sin embargo, la circularización en sí misma no sería el único factor que da lugar al potenciamiento de la traducción y quizás el reconocimiento de una secuencia específica por un factor del huésped, en solitario o junto a la circularización del RNA, sea la responsable de dar traducibilidad a los mRNAs de SINV en células de mosquito. Futuros trabajos en esta dirección clarificarán si estos eventos están operando en células de insecto y hasta qué punto tal mecanismo interviene en otros arbovirus.

## CONCLUSIONES

---



## 6. CONCLUSIONES

- El mRNA genómico de SINV requiere el factor canónico de iniciación eIF4A para su traducción en la etapa temprana de la infección.
- El sgRNA de SINV exhibe un mecanismo dual de traducción con respecto a la utilización del eIF4A: este factor no participa en la traducción del sgRNA en la fase tardía de la infección, tanto en células de mamífero como en células de insecto, pero sí es necesario cuando dicho mRNA, sintetizado *in vitro*, es transfectado en células o traducido en extractos de reticulocitos de conejo.
- Los factores eIF4A, eIF4E y PABP se distribuyen en el citoplasma de las células BHK infectadas por SINV, excluidos de la región perinuclear donde se sintetizan las proteínas virales. En cambio, el eIF3 y el eIF1 sí se concentran en dicha región.
- La estructura DLP confiere independencia del eIF2, pero no del eIF4A, para la traducción del sgRNA en células de mamífero infectadas por SINV. Por el contrario, en células de insecto infectadas, el eIF2 es necesario para la iniciación de la síntesis de proteínas virales y dicha estructura no es funcional.
- El mecanismo de iniciación de la traducción en el sgRNA de SINV implica un proceso de *scanning* de la región 5'-UTR tanto en células de mamífero como de insecto. Se han obtenido evidencias de que no se produce una iniciación interna ni opera un mecanismo de *shunting*.
- Los mRNAs virales derivados del sgRNA de SINV, con dos codones AUGs funcionales, nos permiten afirmar que la estructura DLP es la responsable de que se inicie la traducción en el sgRNA cuando el eIF2 $\alpha$  está fosforilado. El eIF2 no permanece sin fosforilar ni es desfosforilado localizadamente en los sitios de traducción viral.
- Existen secuencias repetidas en la región 3'-UTR de los mRNAs de SINV importantes para su traducción específicamente en células de insecto. En sistemas de mamífero no exhiben ninguna función.
- Secuencias presentes en las regiones 5'-UTR, al comienzo de los mRNAs genómico y subgenómico de SINV, y complementarias a las citadas secuencias de la región 3'-UTR, regulan la traducción y la transcripción de los mRNAs virales en ambos tipos celulares. No se observan evidencias de interacciones RNA-RNA de larga distancia entre las regiones 5' y 3'-UTRs.



# BIBLIOGRAFÍA

---





## BIBLIOGRAFÍA

1. Schwartz O, Albert ML (2010) Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol* 8: 491-500.
2. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 113-127.
3. Strauss JH, Strauss EG (1994) The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 58: 491-562.
4. Haasnoot J, Berkhout B (2011) RNAi and cellular miRNAs in infections by mammalian viruses. *Methods Mol Biol* 721: 23-41.
5. Pager CT, Wehner KA, Fuchs G, Sarnow P (2009) MicroRNA-mediated gene silencing. *Prog Mol Biol Transl Sci* 90: 187-210.
6. Martin KC, Ephrussi A (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136: 719-730.
7. Rodriguez AJ, Czaplinski K, Condeelis JS, Singer RH (2008) Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 20: 144-149.
8. Besse F, Ephrussi A (2008) Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 971-980.
9. Firth AE, Brierley I (2012) Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol* 93: 1385-1409.
10. Kim JH, Park SM, Park JH, Keum SJ, Jang SK (2011) eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *EMBO J* 30: 2454-2464.
11. Redondo N, Sanz MA, Welnowska E, Carrasco L (2011) Translation without eIF2 promoted by poliovirus 2A protease. *PLoS One* 6: e25699.
12. Sanz MA, Castello A, Ventoso I, Berlanga JJ, Carrasco L (2009) Dual mechanism for the translation of subgenomic mRNA from Sindbis virus in infected and uninfected cells. *PLoS One* 4: e4772.
13. Skabkin MA, Skabkina OV, Dhote V, Komar AA, Hellen CU, et al. (2010) Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes Dev* 24: 1787-1801.
14. Dmitriev SE, Terenin IM, Andreev DE, Ivanov PA, Dunaevsky JE, et al. (2010) GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *J Biol Chem* 285: 26779-26787.

15. Parsyan A, Svitkin Y, Shahbazian D, Gkogkas C, Lasko P, et al. (2011) mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 235-245.
16. Thomas MG, Loschi M, Desbats MA, Boccaccio GL (2011) RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal* 23: 324-334.
17. Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, et al. (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 260-265.
18. Pearson CE (2011) Repeat associated non-ATG translation initiation: one DNA, two transcripts, seven reading frames, potentially nine toxic entities! *PLoS Genet* 7: e1002018.
19. Wethmar K, Smink JJ, Leutz A (2010) Upstream open reading frames: molecular switches in (patho)physiology. *Bioessays* 32: 885-893.
20. Castello A, Sanz MA, Molina S, Carrasco L (2006) Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukariotic initiation factor 4G. *J Mol Biol* 355: 942-956.
21. Ventoso I, Sanz MA, Molina S, Berlanga JJ, Carrasco L, et al. (2006) Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev* 20: 87-100.
22. Welnowska E, Sanz MA, Redondo N, Carrasco L (2011) Translation of viral mRNA without active eIF2: the case of picornaviruses. *PLoS One* 6: e22230.
23. Sanz MA, Welnowska E, Redondo N, Carrasco L (2010) Translation driven by picornavirus IRES is hampered from Sindbis virus replicons: rescue by poliovirus 2A protease. *J Mol Biol* 402: 101-117.
24. Sanz MA, Redondo N, Garcia-Moreno M, Carrasco L (2013) Phosphorylation of eIF2alpha is responsible for the failure of the picornavirus internal ribosome entry site to direct translation from Sindbis virus replicons. *J Gen Virol* 94: 796-806.
25. Nasar F, Palacios G, Gorchakov RV, Guzman H, Da Rosa AP, et al. (2012) Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 14622-14627.
26. Forrester NL, Palacios G, Tesh RB, Savji N, Guzman H, et al. (2012) Genome-scale phylogeny of the alphavirus genus suggests a marine origin. *J Virol* 86: 2729-2738.
27. Brown DT, Hernandez R (2012) Infection of cells by alphaviruses. *Adv Exp Med Biol* 726: 181-199.

28. Weaver SC, Winegar R, Manger ID, Forrester NL (2012) Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Res* 94: 242-257.
29. Garmashova N, Gorchakov R, Volkova E, Paessler S, Frolova E, et al. (2007) The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *J Virol* 81: 2472-2484.
30. Griffin DE (2007) Alphaviruses. In: Knipe DM, editor. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1023-1068.
31. Kuhn RJ (2007) Togaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, editor. *Fields Virology*. 5th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1001–1022.
32. Strauss EG, Rice CM, Strauss JH (1983) Sequence coding for the alphavirus nonstructural proteins is interrupted by an opal termination codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5271-5275.
33. de Groot RJ, Hardy WR, Shirako Y, Strauss JH (1990) Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo. *EMBO J* 9: 2631-2638.
34. Schlesinger S, Schlesinger MJ (1996) Togaviridae and their replication. In: Fields BN, et al, editor. *Field's virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. pp. 825-843.
35. Hahn YS, Strauss EG, Strauss JH (1989) Mapping of RNA- temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. *J Virol* 63: 3142-3150.
36. Wang YF, Sawicki SG, Sawicki DL (1991) Sindbis virus nsP1 functions in negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 65: 985-988.
37. Shirako Y, Strauss EG, Strauss JH (2000) Suppressor mutations that allow sindbis virus RNA polymerase to function with nonaromatic amino acids at the N-terminus: evidence for interaction between nsP1 and nsP4 in minus-strand RNA synthesis. *Virology* 276: 148-160.
38. Fata CL, Sawicki SG, Sawicki DL (2002) Modification of Asn374 of nsP1 suppresses a Sindbis virus nsP4 minus-strand polymerase mutant. *J Virol* 76: 8641-8649.
39. Mi S, Durbin R, Huang HV, Rice CM, Stollar V (1989) Association of the Sindbis virus RNA methyltransferase activity with the nonstructural protein nsP1. *Virology* 170: 385-391.
40. Ahola T, Laakkonen P, Vihinen H, Kaariainen L (1997) Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities. *J Virol* 71: 392-397.

41. Peranen J, Laakkonen P, Hyvonen M, Kaariainen L (1995) The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology* 208: 610-620.
42. Salonen A, Vasiljeva L, Merits A, Magden J, Jokitalo E, et al. (2003) Properly folded nonstructural polyprotein directs the semliki forest virus replication complex to the endosomal compartment. *J Virol* 77: 1691-1702.
43. Russo AT, White MA, Watowich SJ (2006) The crystal structure of the Venezuelan equine encephalitis alphavirus nsP2 protease. *Structure* 14: 1449-1458.
44. Gomez de Cedron M, Ehsani N, Mikkola ML, Garcia JA, Kaariainen L (1999) RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Lett* 448: 19-22.
45. Garmashova N, Gorchakov R, Frolova E, Frolov I (2006) Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. *J Virol* 80: 5686-5696.
46. Breakwell L, Dosenovic P, Karlsson Hedestam GB, D'Amato M, Liljestrom P, et al. (2007) Semliki Forest virus nonstructural protein 2 is involved in suppression of the type I interferon response. *J Virol* 81: 8677-8684.
47. Rikkinen M, Peranen J, Kaariainen L (1994) Nuclear targeting of Semliki Forest virus nsP2. *Arch Virol Suppl* 9: 369-377.
48. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, et al. (1992) Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8259-8263.
49. Lulla A, Lulla V, Merits A (2012) Macromolecular assembly-driven processing of the 2/3 cleavage site in the alphavirus replicase polyprotein. *J Virol* 86: 553-565.
50. Vihinen H, Ahola T, Tuittila M, Merits A, Kaariainen L (2001) Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J Biol Chem* 276: 5745-5752.
51. Panas MD, Varjak M, Lulla A, Eng KE, Merits A, et al. (2012) Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection. *Mol Biol Cell* 23: 4701-4712.
52. Fros JJ, Domeradзка NE, Baggen J, Geertsema C, Flipse J, et al. (2012) Chikungunya virus nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci. *J Virol* 86: 10873-10879.
53. Panas MD, Schulte T, Thaa B, Sandalova T, Kedersha N, et al. (2015) Viral and Cellular Proteins Containing FGDF Motifs Bind G3BP to Block Stress Granule Formation. *PLoS Pathog* 11: e1004659.

54. Rubach JK, Wasik BR, Rupp JC, Kuhn RJ, Hardy RW, et al. (2009) Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. *Virology* 384: 201-208.
55. Shirako Y, Strauss JH (1994) Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J Virol* 68: 1874-1885.
56. Lemm JA, Rumenapf T, Strauss EG, Strauss JH, Rice CM (1994) Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *EMBO J* 13: 2925-2934.
57. Shin G, Yost SA, Miller MT, Elrod EJ, Grakoui A, et al. (2012) Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16534-16539.
58. Sonenberg N, Hinnebusch AG (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136: 731-745.
59. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68: 913-963.
60. Derry MC, Yanagiya A, Martineau Y, Sonenberg N (2006) Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 537-543.
61. Lorsch JR, Dever TE (2010) Molecular view of 43 S complex formation and start site selection in eukaryotic translation initiation. *J Biol Chem* 285: 21203-21207.
62. Kozak M (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* 266: 19867-19870.
63. Hinnebusch AG (2011) Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 434-467, first page of table of contents.
64. Asano K, Sachs MS (2007) Translation factor control of ribosome conformation during start codon selection. *Genes Dev* 21: 1280-1287.
65. Pestova TV, Kolupaeva VG (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16: 2906-2922.
66. Kozak M (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234: 187-208.
67. Pisareva VP, Pisarev AV, Komar AA, Hellen CU, Pestova TV (2008) Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* 135: 1237-1250.

68. Abaeva IS, Marintchev A, Pisareva VP, Hellen CU, Pestova TV (2011) Bypassing of stems versus linear base-by-base inspection of mammalian mRNAs during ribosomal scanning. *EMBO J* 30: 115-129.
69. Nanda JS, Saini AK, Munoz AM, Hinnebusch AG, Lorsch JR (2013) Coordinated movements of eukaryotic translation initiation factors eIF1, eIF1A, and eIF5 trigger phosphate release from eIF2 in response to start codon recognition by the ribosomal preinitiation complex. *J Biol Chem* 288: 5316-5329.
70. Luna RE, Arthanari H, Hiraishi H, Nanda J, Martin-Marcos P, et al. (2012) The C-terminal domain of eukaryotic initiation factor 5 promotes start codon recognition by its dynamic interplay with eIF1 and eIF2beta. *Cell Rep* 1: 689-702.
71. Asano K, Shalev A, Phan L, Nielsen K, Clayton J, et al. (2001) Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *EMBO J* 20: 2326-2337.
72. Yamamoto Y, Singh CR, Marintchev A, Hall NS, Hannig EM, et al. (2005) The eukaryotic initiation factor (eIF) 5 HEAT domain mediates multifactor assembly and scanning with distinct interfaces to eIF1, eIF2, eIF3, and eIF4G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16164-16169.
73. Cheung YN, Maag D, Mitchell SF, Fekete CA, Algire MA, et al. (2007) Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo. *Genes Dev* 21: 1217-1230.
74. Lomakin IB, Kolupaeva VG, Marintchev A, Wagner G, Pestova TV (2003) Position of eukaryotic initiation factor eIF1 on the 40S ribosomal subunit determined by directed hydroxyl radical probing. *Genes Dev* 17: 2786-2797.
75. Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, et al. (2000) The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403: 332-335.
76. Lopez-Lastra M, Ramdohr P, Letelier A, Vallejos M, Vera-Otarola J, et al. (2010) Translation initiation of viral mRNAs. *Rev Med Virol* 20: 177-195.
77. Yueh A, Schneider RJ (1996) Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells. *Genes Dev* 10: 1557-1567.
78. Yueh A, Schneider RJ (2000) Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev* 14: 414-421.
79. Fernandez-Miragall O, Hernandez C (2011) An internal ribosome entry site directs translation of the 3'-gene from Pelargonium flower break virus genomic RNA: implications for infectivity. *PLoS One* 6: e22617.
80. Jackson RJ (2013) The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.

81. Belsham GJ (2009) Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Res* 139: 183-192.
82. Fitzgerald KD, Semler BL (2009) Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1789: 518-528.
83. Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T (2009) Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* 1789: 542-557.
84. White JP, Reineke LC, Lloyd RE (2011) Poliovirus switches to an eIF2-independent mode of translation during infection. *J Virol* 85: 8884-8893.
85. Redondo N, Sanz MA, Steinberger J, Skern T, Kusov Y, et al. (2012) Translation directed by hepatitis A virus IRES in the absence of active eIF4F complex and eIF2. *PLoS One* 7: e52065.
86. Hertz MI, Thompson SR (2011) Mechanism of translation initiation by Dicistroviridae IGR IRESs. *Virology* 411: 355-361.
87. Simon AE, Miller WA (2013) 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annu Rev Microbiol* 67: 21-42.
88. Kraft JJ, Treder K, Peterson MS, Miller WA (2013) Cation-dependent folding of 3' cap-independent translation elements facilitates interaction of a 17-nucleotide conserved sequence with eIF4G. *Nucleic Acids Res* 41: 3398-3413.
89. Wang Z, Treder K, Miller WA (2009) Structure of a viral cap-independent translation element that functions via high affinity binding to the eIF4E subunit of eIF4F. *J Biol Chem* 284: 14189-14202.
90. Shatsky IN, Dmitriev SE, Terenin IM, Andreev DE (2010) Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs. *Mol Cells* 30: 285-293.
91. Nicholson BL, White KA (2014) Functional long-range RNA-RNA interactions in positive-strand RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* 12: 493-504.
92. Kneller EL, Rakotondrafara AM, Miller WA (2006) Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res* 119: 63-75.
93. Niepmann M (2009) Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim Biophys Acta* 1789: 529-541.
94. Walsh D (2010) Manipulation of the host translation initiation complex eIF4F by DNA viruses. *Biochem Soc Trans* 38: 1511-1516.

95. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, et al. (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7029-7036.
96. Terenin IM, Dmitriev SE, Andreev DE, Shatsky IN (2008) Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* 15: 836-841.
97. Sanz MA, Castello A, Carrasco L (2007) Viral translation is coupled to transcription in Sindbis virus-infected cells. *J Virol* 81: 7061-7068.
98. Gorchakov R, Frolova E, Frolov I (2005) Inhibition of transcription and translation in Sindbis virus-infected cells. *J Virol* 79: 9397-9409.
99. McInerney GM, Kedersha NL, Kaufman RJ, Anderson P, Liljestrom P (2005) Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol Biol Cell* 16: 3753-3763.
100. Gorchakov R, Frolova E, Williams BR, Rice CM, Frolov I (2004) PKR-dependent and -independent mechanisms are involved in translational shutoff during Sindbis virus infection. *J Virol* 78: 8455-8467.
101. Garry RF (1994) Sindbis virus-induced inhibition of protein synthesis is partially reversed by medium containing an elevated potassium concentration. *J Gen Virol* 75 ( Pt 2): 411-415.
102. Garry RF, Bishop JM, Parker S, Westbrook K, Lewis G, et al. (1979) Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> concentrations and the regulation of protein synthesis in Sindbis virus-infected chick cells. *Virology* 96: 108-120.
103. Frolov I, Garmashova N, Atasheva S, Frolova EI (2009) Random insertion mutagenesis of sindbis virus nonstructural protein 2 and selection of variants incapable of downregulating cellular transcription. *J Virol* 83: 9031-9044.
104. Frolov I, Agapov E, Hoffman TA, Jr., Pragai BM, Lippa M, et al. (1999) Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. *J Virol* 73: 3854-3865.
105. Patel RK, Burnham AJ, Gebhart NN, Sokoloski KJ, Hardy RW (2013) Role for subgenomic mRNA in host translation inhibition during Sindbis virus infection of mammalian cells. *Virology* 441: 171-181.
106. Frolov I, Schlesinger S (1994) Translation of Sindbis virus mRNA: effects of sequences downstream of the initiating codon. *J Virol* 68: 8111-8117.
107. Sanz MA, Garcia-Moreno M, Carrasco L (2014) Inhibition of Host Protein Synthesis by Sindbis Virus: Correlation with Viral Rna Replication and Release of Nuclear Proteins to the Cytoplasm. *Cell Microbiol.*



108. Kim KH, Rumenapf T, Strauss EG, Strauss JH (2004) Regulation of Semliki Forest virus RNA replication: a model for the control of alphavirus pathogenesis in invertebrate hosts. *Virology* 323: 153-163.
109. Patel RK, Hardy RW (2012) Role for the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-TOR pathway during sindbis virus replication in arthropods. *J Virol* 86: 3595-3604.
110. Karpf AR, Brown DT (1998) Comparison of Sindbis virus-induced pathology in mosquito and vertebrate cell cultures. *Virology* 240: 193-201.
111. Frolov I, Schlesinger S (1996) Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation. *J Virol* 70: 1182-1190.
112. Garcia-Moreno M, Sanz MA, Pelletier J, Carrasco L (2013) Requirements for eIF4A and eIF2 during translation of Sindbis virus subgenomic mRNA in vertebrate and invertebrate host cells. *Cell Microbiol* 15: 823-840.
113. Ventoso I (2012) Adaptive changes in alphavirus mRNA translation allowed colonization of vertebrate hosts. *J Virol* 86: 9484-9494.
114. van Steeg H, van Grinsven M, van Mansfeld F, Voorma HO, Benne R (1981) Initiation of protein synthesis in neuroblastoma cells infected by Semliki Forest Virus. A decreased requirement of late viral mRNA for eIF-4B and cap binding protein. *FEBS Lett* 129: 62-66.
115. Berben-Bloemheuvel G, Kasperaitis MA, van Heugten H, Thomas AA, van Steeg H, et al. (1992) Interaction of initiation factors with the cap structure of chimaeric mRNA containing the 5'-untranslated regions of Semliki Forest virus RNA is related to translational efficiency. *Eur J Biochem* 208: 581-587.
116. Gillies S, Stollar V (1981) Translation of vesicular stomatitis and Sindbis virus mRNAs in cell-free extracts of *Aedes albopictus* cells. *J Biol Chem* 256: 13188-13192.
117. Mir MA, Panganiban AT (2008) A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *EMBO J* 27: 3129-3139.
118. Burgui I, Yanguez E, Sonenberg N, Nieto A (2007) Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J Virol* 81: 12427-12438.
119. Montgomery SA, Berglund P, Beard CW, Johnston RE (2006) Ribosomal protein S6 associates with alphavirus nonstructural protein 2 and mediates expression from alphavirus messages. *J Virol* 80: 7729-7739.
120. Komar AA, Mazumder B, Merrick WC (2012) A new framework for understanding IRES-mediated translation. *Gene* 502: 75-86.

121. Hardy RW (2006) The role of the 3' terminus of the Sindbis virus genome in minus-strand initiation site selection. *Virology* 345: 520-531.
122. Ou JH, Trent DW, Strauss JH (1982) The 3'-non-coding regions of alphavirus RNAs contain repeating sequences. *J Mol Biol* 156: 719-730.
123. Barnhart MD, Moon SL, Emch AW, Wilusz CJ, Wilusz J (2013) Changes in cellular mRNA stability, splicing, and polyadenylation through HuR protein sequestration by a cytoplasmic RNA virus. *Cell Rep* 5: 909-917.
124. Dickson AM, Anderson JR, Barnhart MD, Sokoloski KJ, Oko L, et al. (2012) Dephosphorylation of HuR protein during alphavirus infection is associated with HuR relocalization to the cytoplasm. *J Biol Chem* 287: 36229-36238.
125. Sokoloski KJ, Dickson AM, Chaskey EL, Garneau NL, Wilusz CJ, et al. (2010) Sindbis virus usurps the cellular HuR protein to stabilize its transcripts and promote productive infections in mammalian and mosquito cells. *Cell Host Microbe* 8: 196-207.
126. Pfeffer M, Kinney RM, Kaaden OR (1998) The alphavirus 3'-nontranslated region: size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements. *Virology* 240: 100-108.
127. Gritsun TS, Gould EA (2006) Direct repeats in the 3' untranslated regions of mosquito-borne flaviviruses: possible implications for virus transmission. *J Gen Virol* 87: 3297-3305.
128. Garneau NL, Sokoloski KJ, Opyrchal M, Neff CP, Wilusz CJ, et al. (2008) The 3' untranslated region of sindbis virus represses deadenylation of viral transcripts in mosquito and Mammalian cells. *J Virol* 82: 880-892.
129. Kuhn RJ, Hong Z, Strauss JH (1990) Mutagenesis of the 3' nontranslated region of Sindbis virus RNA. *J Virol* 64: 1465-1476.
130. Kuhn RJ, Griffin DE, Zhang H, Niesters HG, Strauss JH (1992) Attenuation of Sindbis virus neurovirulence by using defined mutations in nontranslated regions of the genome RNA. *J Virol* 66: 7121-7127.
131. Yang YL, Reis LF, Pavlovic J, Aguzzi A, Schafer R, et al. (1995) Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J* 14: 6095-6106.
132. Bick MJ, Carroll JW, Gao G, Goff SP, Rice CM, et al. (2003) Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J Virol* 77: 11555-11562.

133. Gebauer F, Corona DF, Preiss T, Becker PB, Hentze MW (1999) Translational control of dosage compensation in *Drosophila* by Sex-lethal: cooperative silencing via the 5' and 3' UTRs of msl-2 mRNA is independent of the poly(A) tail. *EMBO J* 18: 6146-6154.
134. Álvarez E (2004) Modificación de la maquinaria de iniciación de la traducción por proteasas retrovirales. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
135. Aldabe R, Feduchi E, Novoa I, Carrasco L (1995) Efficient cleavage of p220 by poliovirus 2Apro expression in mammalian cells: effects on vaccinia virus. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 928-936.
136. Madan V, Castello A, Carrasco L (2008) Viroporins from RNA viruses induce caspase-dependent apoptosis. *Cell Microbiol* 10: 437-451.
137. Feduchi E, Aldabe R, Novoa I, Carrasco L (1995) Effects of poliovirus 2A(pro) on vaccinia virus gene expression. *Eur J Biochem* 234: 849-854.
138. Bolte S, Cordelieres FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213-232.
139. Hofacker IL (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* 31: 3429-3431.
140. Sambrook JF, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
141. Lindqvist L, Oberer M, Reibarkh M, Cencic R, Bordeleau ME, et al. (2008) Selective pharmacological targeting of a DEAD box RNA helicase. *PLoS One* 3: e1583.
142. Connor JH, Lyles DS (2002) Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J Virol* 76: 10177-10187.
143. Welnowska E, Castello A, Moral P, Carrasco L (2009) Translation of mRNAs from vesicular stomatitis virus and vaccinia virus is differentially blocked in cells with depletion of eIF4GI and/or eIF4GII. *J Mol Biol* 394: 506-521.
144. Bordeleau ME, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS, et al. (2006) Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol* 2: 213-220.
145. Ulmanen I, Soderlund H, Kaariainen L (1976) Semliki Forest virus capsid protein associates with the 60S ribosomal subunit in infected cells. *J Virol* 20: 203-210.
146. Soderlund H, Ulmanen I (1977) Transient association of Semliki Forest virus capsid protein with ribosomes. *J Virol* 24: 907-909.

147. Mazroui R, Sukarieh R, Bordeleau ME, Kaufman RJ, Northcote P, et al. (2006) Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  phosphorylation. *Mol Biol Cell* 17: 4212-4219.
148. Fata-Hartley CL, Palmenberg AC (2005) Dipyridamole reversibly inhibits mengovirus RNA replication. *J Virol* 79: 11062-11070.
149. Mohankumar V, Dhanushkodi NR, Raju R (2011) Sindbis virus replication, is insensitive to rapamycin and torin1, and suppresses Akt/mTOR pathway late during infection in HEK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 406: 262-267.
150. Moerke NJ, Aktas H, Chen H, Cantel S, Reibarkh MY, et al. (2007) Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell* 128: 257-267.
151. Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN (1998) Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J Biol Chem* 273: 18599-18604.
152. McMahon R, Zaborowska I, Walsh D (2011) Noncytotoxic inhibition of viral infection through eIF4F-independent suppression of translation by 4EGi-1. *J Virol* 85: 853-864.
153. Bushell M, Sarnow P (2002) Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J Cell Biol* 158: 395-399.
154. Jan E, Sarnow P (2002) Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol* 324: 889-902.
155. Kozak M (1990) Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8301-8305.
156. Babendure JR, Babendure JL, Ding JH, Tsien RY (2006) Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA* 12: 851-861.
157. Kozak M (1997) Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J* 16: 2482-2492.
158. Kozak M (1989) Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* 9: 5134-5142.
159. Linero FN, Thomas MG, Boccaccio GL, Sclaro LA (2011) Junin virus infection impairs stress-granule formation in Vero cells treated with arsenite via inhibition of eIF2 $\alpha$  phosphorylation. *J Gen Virol* 92: 2889-2899.

160. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5: 897-904.
161. Frey TK, Gard DL, Strauss JH (1979) Biophysical studies on circle formation by Sindbis virus 49 S RNA. *J Mol Biol* 132: 1-18.
162. Hsu MT, Kung HJ, Davidson N (1974) An electron microscope study of Sindbis virus RNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 38: 943-950.
163. Frolov I, Hardy R, Rice CM (2001) Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA* 7: 1638-1651.
164. Chen R, Wang E, Tsetsarkin KA, Weaver SC (2013) Chikungunya virus 3' untranslated region: adaptation to mosquitoes and a population bottleneck as major evolutionary forces. *PLoS Pathog* 9: e1003591.
165. Forrester NL, Coffey LL, Weaver SC (2014) Arboviral Bottlenecks and Challenges to Maintaining Diversity and Fitness during Mosquito Transmission. *Viruses* 6: 3991-4004.
166. Nickens DG, Hardy RW (2008) Structural and functional analyses of stem-loop 1 of the Sindbis virus genome. *Virology* 370: 158-172.
167. Levis R, Schlesinger S, Huang HV (1990) Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription. *J Virol* 64: 1726-1733.
168. Wielgosz MM, Raju R, Huang HV (2001) Sequence requirements for Sindbis virus subgenomic mRNA promoter function in cultured cells. *J Virol* 75: 3509-3519.
169. Raju R, Huang HV (1991) Analysis of Sindbis virus promoter recognition in vivo, using novel vectors with two subgenomic mRNA promoters. *J Virol* 65: 2501-2510.
170. Ou JH, Rice CM, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH (1982) Sequence studies of several alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 5235-5239.
171. Carrasco L, Smith AE (1976) Sodium ions and the shut-off of host cell protein synthesis by picornaviruses. *Nature* 264: 807-809.
172. Nieva JL, Madan V, Carrasco L (2012) Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol* 10: 563-574.

173. van Steeg H, Thomas A, Verbeek S, Kasperaitis M, Voorma HO, et al. (1981) Shutoff of neuroblastoma cell protein synthesis by Semliki Forest virus: loss of ability of crude initiation factors to recognize early Semliki Forest virus and host mRNA's. *J Virol* 38: 728-736.
174. Tamm K, Merits A, Sarand I (2008) Mutations in the nuclear localization signal of nsP2 influencing RNA synthesis, protein expression and cytotoxicity of Semliki Forest virus. *J Gen Virol* 89: 676-686.
175. Valasek LS (2012) 'Ribozoomin'--translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). *Curr Protein Pept Sci* 13: 305-330.
176. Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15: 8125-8148.
177. van Duijn LP, Holsappel S, Kasperaitis M, Bunschoten H, Konings D, et al. (1988) Secondary structure and expression in vivo and in vitro of messenger RNAs into which upstream AUG codons have been inserted. *Eur J Biochem* 172: 59-66.
178. Karlsen M, Villoing S, Rimstad E, Nylund A (2009) Characterization of untranslated regions of the salmonid alphavirus 3 (SAV3) genome and construction of a SAV3 based replicon. *Virol J* 6: 173.
179. Rumenapf T, Strauss EG, Strauss JH (1995) Aura virus is a New World representative of Sindbis-like viruses. *Virology* 208: 621-633.
180. Hanley KA, Manlucu LR, Gilmore LE, Blaney JE, Jr., Hanson CT, et al. (2003) A trade-off in replication in mosquito versus mammalian systems conferred by a point mutation in the NS4B protein of dengue virus type 4. *Virology* 312: 222-232.
181. Villordo SM, Gamarnik AV (2013) Differential RNA sequence requirement for dengue virus replication in mosquito and mammalian cells. *J Virol* 87: 9365-9372.
182. Weston J, Villoing S, Bremont M, Castric J, Pfeffer M, et al. (2002) Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection. *J Virol* 76: 6155-6163.
183. Hikke MC, Verest M, Vlak JM, Pijlman GP (2014) Salmonid alphavirus replication in mosquito cells: towards a novel vaccine production system. *Microb Biotechnol* 7: 480-484.
184. Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, et al. (2001) Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J Virol* 75: 10118-10131.
185. Meulewaeter F, Danthinne X, Van Montagu M, Cornelissen M (1998) 5'- and 3'-sequences of satellite tobacco necrosis virus RNA promoting translation in tobacco. *Plant J* 14: 169-176.

186. Kuhn RJ, Griffin DE, Owen KE, Niesters HG, Strauss JH (1996) Chimeric Sindbis-Ross River viruses to study interactions between alphavirus nonstructural and structural regions. *J Virol* 70: 7900-7909.
187. Kuhn RJ, Niesters HG, Hong Z, Strauss JH (1991) Infectious RNA transcripts from Ross River virus cDNA clones and the construction and characterization of defined chimeras with Sindbis virus. *Virology* 182: 430-441.
188. Wilson JE, Pestova TV, Hellen CU, Sarnow P (2000) Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* 102: 511-520.
189. Alvarez E, Menendez-Arias L, Carrasco L (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases. *J Virol* 77: 12392-12400.
190. Sanz MA, Carrasco L (2001) Sindbis virus variant with a deletion in the 6K gene shows defects in glycoprotein processing and trafficking: lack of complementation by a wild-type 6K gene in trans. *J Virol* 75: 7778-7784.





## ANEXO I

---



## ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla S1.** Nomenclatura de plásmidos, replicones, sgRNAs y mRNAs del apartado 4.1.

Plásmido	Replicón / gmRNA	sgmRNA	mRNA	Producto obtenido mediante transcripción <i>in vitro</i>
pT7 rep LPol-luc [23]	rep LPol-luc	LPol-luc		Replicón con las nsPs de SINV y la proteína C seguida del gen luc. El IRES de PV sustituye a la L26S.
pT7 rep LEMCV-luc [23]	rep LEMCV-luc	LEMCV-luc		Replicón con las nsPs de SINV y la proteína C seguida del gen luc. El IRES de EMCV sustituye a la L26S.
pT7 rep C+2A [20]	rep C+2A	C+2A		Replicón de SINV con la proteína C seguida del gen de la proteasa 2A de PV.
pT7 rep C+2A(G60R) [23]	rep C+2A(G60R)	C+2A(G60R)		Replicón de SINV con la proteína C seguida del gen de la proteasa mutante 2A(G60R) de PV, que es una variante proteolíticamente inactiva.
pToto1101/Luc [132]	SV-Luc	wt SV sgmRNA		gmRNA recombinante de SINV con el gen luc dentro de la secuencia de nsP3.
Rz-pMluz [148]	Replicón Mengo-luc			Replicón de Mengovirus con el gen luc sustituyendo a la mitad 3' de la región 1C, la región completa de 1D, y los dos primeros codones de la región viral 2A.
pT7 rep C+luc [97]	rep C+luc	C+luc		Replicón de SINV con la proteína C seguida del gen luc.
pT7 rep C+luc $\Delta$ DLP	rep C+luc $\Delta$ DLP	C+luc $\Delta$ DLP		Replicón de SINV con la proteína C seguida del gen luc. La estructura DLP localizada en la región codificante de C está desorganizada.
pT7 C+luc [97]		C+luc		sgmRNA de SINV con la proteína C seguida del gen luc. Este mRNA es incapaz de replicar.
pT7 C+luc $\Delta$ DLP		C+luc $\Delta$ DLP		sgmRNA de SINV con la proteína C seguida del gen luc. La estructura DLP localizada en la región codificante de C está desorganizada. Este mRNA es incapaz de replicar.
T7 Rluc $\Delta$ EMCV IGR-Fluc [188]			CrPV IGR-luc	mRNA con el gen luc bajo el control del IRES de la IGR de CrPV.
pTM1-luc [189]			IRES EMCV-luc	mRNA con el gen luc bajo el control del IRES de EMCV.
pT7 SVwt [190]	wt	wt		Genoma de SINV con todas las proteínas replicativas y estructurales.
pT7 SV $\Delta$ DLP [21]	wt	$\Delta$ DLP		Genoma de SINV con todas las proteínas replicativas y estructurales. La estructura DLP localizada en la región codificante de C está desorganizada.

**Tabla S2.** Listado de primers usados en los apartados 4.1. y 4.2.

Mutante	Primers	Secuencia 5' → 3'
hp	5'hp	CATCTGACTAATAACGGGGCGCGTGGTGCGGCTGCAGCCGCCACCACGCG CCCCTACAACACCACCACCATGAATAG
	3'hp	GTGGTGTTGTAGGGGCGCGTGGTGCGGCTGCAGCCGCCACCACGCG CCCCGTATTAGTCAGATGAAATG
AUG-hp	5'AUG-hp	CATCTGACTAATAACAGCTCAACCATGGTCACACAAGCTTTGGGGCGCGTGG TGGCGGC
	3'AUG-hp	CCACCACGCGCCCCAAAGCTTGTGTGACCATGGTTGAGCTGTATTAGTCAG ATGAAATG
CAA <sub>14</sub>	5'CAA <sub>14</sub>	CATCTGACTAATAACCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA CAACAATACAACACCACCACCATGAATAG
	3'CAA <sub>14</sub>	GTGGTGTTGTATTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG TTGGTATTAGTCAGATGAAATG
AUG- CAA <sub>14</sub>	5'AUG-CAA <sub>14</sub>	AGCTCAACCATGGTCACACAAGCTTTCCAACAACAACAACAACAACA ACAACAACAACAACAACAATAACAAC
	3'AUG-CAA <sub>14</sub>	GTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGGAAAGCTTGTGTGACCATGGTTGAGCTGTATTA GTCAGATG
LhpL	3'LhpL	GGCGGCTGCAGCCGCCACCACGCGCCCCCAGCATGTTAAAGAATCCTCTATT CATGGTGTTGTTGTAGTATTAGTCAGATGAAATG
STOP	5'STOPAUG- hp	GGCGGCTGCAGCCGCCACCACGCGCCCCCTACAACACCTAGTGAACCACCA TGAATAG
hpSTOPhp2	5'hpSTOPhp2	GGCGGCTGCAGCCGCCACCACGCGCCCCCTACAACACCTAGTGATCACAAC AACAAACGGCCGGTCGACCCGGGAATTCCCGGGTCGACCGCCGGACCACC ATGAATAGAG
hSTOPp	3'hSTOPp	GGCGGCTGCAGCTCACTACGCCACCACGCGCCCCAAAGCTTGTGTGACCAT GGTTG
hp30	5'hp30	GGCGGCTGCAGCCGCCACCACGCGCCCCCTCATCTGACTAATACTACAACAC CACCACCATGAATAGAGG
	5' Hpa	GCTATGGCGTTAACCGGTCTG
	3' Aat	CGTTCTTGACGTCGAAC
	5'SacI-T7prom	GCGCGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAGATAGTCAGCATAGT
	Left luc2	AGGTCTTCCCGACGATGA
	Right luc2	GTCTTTCCGTGCTCCAAAAC
	Left Act2	CTCTCCCTCATGCCATCCT
	Right Act2	GTAGCCACGCTCGGTCAG

**Tabla S3.** Nomenclatura de plásmidos, replicones, sgmRNAs y mRNAs del apartado 4.2.

Plásmido	Replicón/gmRNA	sgmRNA	Producto obtenido mediante transcripción <i>in vitro</i>
pT7 rep C+luc	rep C+luc	C+luc	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc.
pT7 rep C+luc hp	rep C+luc hp	C+luc hp	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene una horquilla <i>hp</i> .
pT7 rep C+luc AUG-hp	rep C+luc AUG-hp	C+luc AUG-hp	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene un codón AUG antes de una horquilla <i>hp</i> .
pT7 rep C+luc CAA <sub>14</sub>	rep C+luc CAA <sub>14</sub>	C+luc CAA <sub>14</sub>	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene 14 codones CAA.
pT7 rep C+luc AUG-CAA <sub>14</sub>	rep C+luc AUG-CAA <sub>14</sub>	C+luc AUG-CAA <sub>14</sub>	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene un codón AUG antes de 14 codones CAA.
pT7 rep C+luc LhpL	rep C+luc LhpL	C+luc LhpL	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene una duplicación de los nts 35-75 (incluyendo el AUGi genuino), antes y después de una horquilla <i>hp</i> .
pT7 rep C+luc STOP	rep C+luc STOP	C+luc STOP	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene un codón AUG antes de una horquilla <i>hp</i> y dos codones de parada posteriores a la horquilla <i>hp</i> .
pT7 rep C+luc hpSTOPhp2	rep C+luc hpSTOPhp2	C+luc hpSTOPhp2	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene un codón AUG antes de una horquilla <i>hp</i> , dos codones de parada posteriores a la horquilla <i>hp</i> , y a continuación otra horquilla.
pT7 rep C+luc hSTOPp	rep C+luc hSTOPp	C+luc hSTOPp	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene un codón AUG antes de una horquilla <i>hp</i> con dos codones de parada internos.
pT7 rep C+luc hp30	rep C+luc hp30	C+luc hp30	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene una horquilla <i>hp</i> , separada en 30 nts del AUGi genuino.
pT7 C+luc		C+luc	sgmRNA de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. Este mRNA es incapaz de replicar.
pT7 C+luc hp		C+luc hp	sgmRNA de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene una horquilla <i>hp</i> . Este mRNA es incapaz de replicar.
pT7 C+luc AUG-hp		C+luc AUG-hp	sgmRNA de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene un codón AUG antes de una horquilla <i>hp</i> . Este mRNA es incapaz de replicar.
pT7 C+luc CAA <sub>14</sub>		C+luc CAA <sub>14</sub>	sgmRNA de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene 14 codones CAA. Este mRNA es incapaz de replicar.
pT7 C+luc AUG-CAA <sub>14</sub>		C+luc AUG-CAA <sub>14</sub>	sgmRNA de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La L26S contiene un codón AUG antes de 14 codones CAA. Este mRNA es incapaz de replicar.
pT7 SVwt	wt	wt	Genoma de SIN V con todas las proteínas replicativas y estructurales.
pT7 SV AUG-CAA <sub>14</sub>	AUG-CAA <sub>14</sub>	AUG-CAA <sub>14</sub>	Genoma de SIN V con todas las proteínas replicativas y estructurales. La L26S contiene un codón AUG antes de 14 codones CAA.

**Tabla S4.** Nomenclatura de plásmidos, replicones, sgmRNAs y mRNAs del apartado 4.3.

Plásmido	Replicón/gmRNA	sgmRNA	Producto obtenido mediante transcripción <i>in vitro</i>
pT7 rep C+luc	rep C+luc wt	C+luc wt	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc.
pT7 rep C+luc sg5'/12-18	rep C+luc 5'/12-18	C+luc 5'/12-18	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. Los nts 12 a 18 de la 5'-UTR del sgmRNA están mutados.
pT7 rep C+luc sg5'/16-18	rep C+luc 5'/16-18	C+luc 5'/16-18	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. Los nts 16 a 18 de la 5'-UTR del sgmRNA están mutados.
pT7 rep C+luc sg5'/dSL1	rep C+luc 5'/dSL1	C+luc 5'/dSL1	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La estructura SL1 de la 5'-UTR del sgmRNA está desorganizada.
pT7 rep C+luc 3'/1	rep C+luc 3'/1	C+luc 3'/1	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La secuencia Sec1 de la 3'UTR está mutada.
pT7 rep C+luc 3'/2	rep C+luc 3'/2	C+luc 3'/2	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La secuencia Sec2 de la 3'UTR está mutada.
pT7 rep C+luc 3'/3	rep C+luc 3'/3	C+luc 3'/3	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. La secuencia Sec3 de la 3'UTR está mutada.
pT7 rep C+luc 3'/1+2	rep C+luc 3'/12	C+luc 3'/12	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. Las secuencias Sec1 y Sec2 de la 3'UTR están mutadas.
pT7 rep C+luc 3'/1+2+3	rep C+luc 3'/123	C+luc 3'/123	Replicón de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. Las secuencias Sec1, Sec2 y Sec3 de la 3'UTR están mutadas.
pToto1101/Luc ΔnsP4	SV-Luc ΔnsP4 wt		gmRNA recombinante de SIN V con el gen luc dentro de la secuencia de nsP3. Este mRNA es incapaz de replicar al no tener la secuencia de nsP4 completa.
pToto1101/Luc ΔnsP4 g5'/12-18	SV-Luc ΔnsP4 5'/12-18		gmRNA recombinante de SIN V con el gen luc dentro de la secuencia de nsP3. Este mRNA es incapaz de replicar al no tener la secuencia de nsP4 completa. Los nts 12 a 18 de la 5'-UTR del gmRNA están mutados.
pToto1101/Luc ΔnsP4 3'/1+2	SV-Luc ΔnsP4 3'/12		gmRNA recombinante de SIN V con el gen luc dentro de la secuencia de nsP3. Este mRNA es incapaz de replicar al no tener la secuencia de nsP4 completa. Las secuencias Sec1 y Sec2 de la 3'UTR están mutadas.
pToto1101/Luc ΔnsP4 3'/1+2+3	SV-Luc ΔnsP4 3'/123		gmRNA recombinante de SIN V con el gen luc dentro de la secuencia de nsP3. Este mRNA es incapaz de replicar al no tener la secuencia de nsP4 completa. Las secuencias Sec1, Sec2 y Sec3 de la 3'UTR están mutadas.
pToto1101/Luc ΔnsP4 g5'/12-18 + 3'/1+2+3	SV-Luc ΔnsP4 5'+3'		gmRNA recombinante de SIN V con el gen luc dentro de la secuencia de nsP3. Este mRNA es incapaz de replicar al no tener la secuencia de nsP4 completa. Los nts 12 a 18 de la 5'-UTR del gmRNA y las secuencias Sec1, Sec2 y Sec3 de la 3'UTR están mutados.
pT7 C+luc		C+luc wt	sgmRNA de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. Este mRNA es incapaz de replicar.
pT7 C+luc sg5'/12-18		C+luc 5'/12-18	sgmRNA de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. Este mRNA es incapaz de replicar. Los nts 12 a 18 de la 5'-UTR del sgmRNA están mutados.
pT7 C+luc 3'/1		C+luc 3'/1	sgmRNA de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. Este mRNA es incapaz de replicar. La secuencia Sec1 de la 3'UTR está mutada.
pT7 C+luc 3'/2		C+luc 3'/2	sgmRNA de SIN V con la proteína C seguida del gen luc. Este mRNA es incapaz de replicar. La secuencia Sec2 de la 3'UTR está mutada.

pT7 C+luc 3'/3		C+luc 3'/3	sgmRNA de SINV con la proteína C seguida del gen luc. Este mRNA es incapaz de replicar. La secuencia Sec3 de la 3'UTR está mutada.
pT7 C+luc 3'/1+2		C+luc 3'/12	sgmRNA de SINV con la proteína C seguida del gen luc. Este mRNA es incapaz de replicar. Las secuencias Sec1 y Sec2 de la 3'UTR están mutadas.
pT7 C+luc 3'/1+2+3		C+luc 3'/123	sgmRNA de SINV con la proteína C seguida del gen luc. Este mRNA es incapaz de replicar. Las secuencias Sec1, Sec2 y Sec3 de la 3'UTR están mutadas.
pT7 C+luc sg5'/12-18 + 3'/1+2+3		C+luc 5'+3'	sgmRNA de SINV con la proteína C seguida del gen luc. Este mRNA es incapaz de replicar. Los nts 12 a 18 de la 5'-UTR del sgmRNA y las secuencias Sec1, Sec2 y Sec3 de la 3'UTR están mutados.

**Tabla S5.** Lista de plásmidos, plásmidos molde y primers usados en el apartado 4.3.

Plásmidos	Plásmidos molde	Primers	Secuencia 5'→3'
pT7 rep C+luc sg5'/12-18	pT7 rep C+luc	5' 7nts	ATAGTCAGCATGAGCGTATTCATCTGACTAATAC
		3' 7nts	GTATTAGTCAGATGAATACGCTCATGCTGACTAT
pT7 rep C+luc sg5'/16-18	pT7 rep C+luc	5' 3nts	ATAGTCAGCATAGTAGTATTCATCTGACTAATAC
		3' 3nts	GTATTAGTCAGATGAATACTACTATGCTGACTAT
pT7 rep C+luc sg5'/dSL1	pT7 rep C+luc	5' dSL1	CAGCATAGTACATTTCTAATATAATATACTAC AACACC
		3' dSL1	GGTGTGTAGTATATTATATTAGAAATGTACTATGCTG
pT7 rep C+luc 3'/1	pT7 rep C+luc	5' Mut1	GATCCGACCAGCAAACTCGTACGCTCTCCG AGGAACTGATGTGCATAATGCATCAGGCTGGTACATTAG
		3' Mut1	GATCTAATGTACCAGCCTGATGCATTATGCACATCAGTTCCCTCGGAGAGCGTACGAGTTTTGCTGGTCGGATCATTGGGGC
pT7 rep C+luc 3'/2	pT7 rep C+luc	5' Mut2	GCAATATAGCAACACTAAAACTCGTACGCTCTCCGAGGAAGCGCAGTGCATAATGCTGCGCAGTGTGCCACATAACCAC
		3' Mut2	CAACACTGCGCAGCATTATGCACTGCGCTTCC TCGGAGAGCGTACGAGTTTTTAGTGTGCTATATTGCCCCG
pT7 rep C+luc 3'/3	pT7 rep C+luc	5' Mut3	CATTTATCTAGCGGACGCCAAAACTCATACGCTCTCTGAGGAAGCGTGGTGCATAATGCCACGCAGCGTCTGCATAAC
		3' Mut3	GTTATGCAGACGCTGCGTGGCATTATGCACCA CGCTTCCTCAGAGAGCGTATGAGTTTTTGGCGTCCGCTAGATAAATG
pT7 rep C+luc 3'/1+2	pT7 rep C+luc 3'/1	5' Mut2	
		3' Mut2	
pT7 rep C+luc 3'/1+2+3	pT7 rep C+luc 3'/1+2	5' Mut3	
		3' Mut3	
		5'SacI-T7prom	GCGCGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAGATAGTCAGCATAGT
		3' Aat	CGTTCCTTGACGTCGAAC
		5' gen7	GACGGCGTGAGCGTAACTATTGAATC
		3' AfeI-gen7	CATGGGAAAAGCGCTAAAAGAGGCTGGG
		5' SacI-gen7	CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGC
		3' gen7	CAATAGTTACGCTCACGCCGTCAATC



## ANEXO II

---



## ANEXO II. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Publicaciones que forman parte de esta tesis doctoral:

**García-Moreno M**, Sanz MA, Pelletier J, Carrasco L. *Requirements for eIF4A and eIF2 during translation of Sindbis virus subgenomic mRNA in vertebrate and invertebrate host cells*. Cell Microbiol. 2013 May;15(5):823-40.

Redondo N, **García-Moreno M**, Sanz MA, Carrasco L. *Translation of viral mRNAs that do not require eIF4E is blocked by the inhibitor 4EGI-1*. Virology. 2013 Sep;444(1-2):171-80.

**García-Moreno M**, Sanz MA, Carrasco L. *Initiation codon selection is accomplished by a scanning mechanism without crucial initiation factors in Sindbis virus subgenomic mRNA*. RNA. 2015 Jan;21(1):93-112.

Otras publicaciones durante el desarrollo de la tesis doctoral:

Sanz MA, Redondo N, **García-Moreno M**, Carrasco L. *Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is responsible for the failure of the picornavirus internal ribosome entry site to direct translation from Sindbis virus replicons*. J Gen Virol. 2013 Apr;94(Pt 4):796-806.

Sanz MA, **García-Moreno M**, Carrasco L. *Inhibition of host protein synthesis by Sindbis virus: correlation with viral RNA replication and release of nuclear proteins to the cytoplasm*. Cell Microbiol. 2014 Oct 20.

González-Almela E, Sanz MA, **García-Moreno M**, Northcote P, Pelletier J, Carrasco L. *Differential action of pantoic acid on translation of genomic and subgenomic mRNAs from Sindbis virus*. Enviado para publicación.

